

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002457

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: 04090089.6  
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 April 2005 (13.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

11.02.05

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°

04090089.6

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk





PGT/EP200 5 / 0 0 2 4 5 7

11.03.05

Anmeldung Nr:  
Application no.: 04090089.6  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 05.03.04  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A01H/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PL PT RO SE SI SK TR LI





Bayer CropScience GmbH

## **Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender**

### **5 Enzyme**

#### **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des

Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der  
5 Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  
10  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch  
15 verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

20 Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das  
25 Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die  
30 Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten  
5 nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen-  
10 oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

15

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis  
20 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist; für verschiedene Stärken, wie z.B.  
25 Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais  
30 konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996,

Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten  
5 Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature  
10 Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen.  
15 R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa  
20 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002,  
25 PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben.  
30 Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren, als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

15

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

25

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und gleichzeitig mindestens eines R1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-

30 Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und (gleichzeitig) mindestens eines R1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht  
5 genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische  
10 Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die  
15 Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden  
20 Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden,  
25 unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener  
30 Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1 Proteinen in den Zellen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines R1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die R1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an R1 Protein in  
5 den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von R1 Proteinen in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an Transkripten, die OK1 Proteine oder R1 Proteine codieren. Dieses  
10 kann z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR erfolgen. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an  
15 Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein R1 Protein, bedeutet auch, dass  
20 Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen.

25 Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins oder eines R1 Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung  
30 der Menge Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der



Menge an OK1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an R1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder

5 Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines R1 Proteins aufweisen.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten

10 Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit

15 einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10). Ein Antikörper, mit welchem eine Erhöhung der Menge an R1 Protein mittels immunologischer Methoden festgestellt werden kann, ist bei Lorberth et al. (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und Ritte et al. (2000, Plant Journal 21, 387-391) beschrieben.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an

25 kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste.

Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres

30 Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein Ok1

Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.

Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position

5 eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.

10 Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuresequenzen zwei Histidine.

15 Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt  
20 führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.

Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

25

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen

30 Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen

dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „R1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf Stärke überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf werden jedoch von einem R1 Protein phosphoryliert. D.h. nicht-phosphorylierte-Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante wird in einer durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierungsreaktion als Substrat verwendet.

Bevorzugt wird von einem R1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht AMP (Adenosinmonophosphat). Ein R1 Protein wird daher als [alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. als Stärke- Wasser-Dikinase bezeichnet (E.C.: 2.7.9.4; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierung von Stärke entstehen mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle der betreffenden Stärke. Von einem R1 Protein werden ca. 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position und ca. 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke eingeführt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer Stärke durch ein R1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des R1 Proteins gebunden ist (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des R1 Proteins, d.h. das R1 Protein selbst katalysiert die

- Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von R1 Proteine codierenden
- 5 Aminosäuresequenzen ein Histidin. Durch die Autophosphorylierung eines R1 Proteins wird ein Histidinrest in einer Phosphohistidindomäne der Aminosäuresequenz, codierend ein R1 Protein, phosphoryliert (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999).
- 10 Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444,
- 15 GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben. Die genannten Nucleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen codierend R1 Proteine sind u.a. veröffentlicht vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) und sind durch Nennung der Referenzen
- 20 ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die

25 Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden

30 Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, 5 Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

- 10 Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* 15 Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest 20 in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* 25 (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch 30 phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten  
5 Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Szintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten  
10 unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Die Aktivität eines R1 Proteins kann z.B. nachgewiesen werden wie in der Literatur beschrieben (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999; Ritte et al., 2002, PNAS 99,  
15 7166-7171).

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al.  
20 (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder  
25 C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

30

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in Stärke von einem R1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch

Analyse der durch ein R1 Protein phosphorylierten Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

5

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke oder die von einem R1 Protein phosphorylierte Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke bzw. der Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte

10 Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein oder R1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

15 Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) oder Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

20

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu

25 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt  
30 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des

Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des



Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine  
5 Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose, kein signifikant erhöhtes Signal für mit  $^{33}\text{P}$  markierte alpha-1,4-Glucose aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein  
10 Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins  
15 mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und  
20 insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt  
25 wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierter-Stärke verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken  
30 können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich

enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im  
5 Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander  
getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke  
(Ansatz (B)) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden  
Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie  
gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-  
10 Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-  
phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die  
betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten  
Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden  
Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.  
15 Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des  
Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des  
Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration,  
chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese  
etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A  
20 mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann  
ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke  
im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen  
eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-  
phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten in Beispiel 8  
25 beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus  
*Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz  
codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

30

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen  
Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID

NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

5

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf. Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis*  
10 *thaliana* eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine  
15 erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das  
20 Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen  
25 Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression eines fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten  
30 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression

eingeführter Nucleinsäuremoleküle eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eine Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins.

Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann ein fremdes Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.

30

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein

fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert, bevorzugt ein R1 Protein aus Kartoffel oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel mit der in GenBank Acc.: Y09533 (22-JUL-2003 Rel. 76, Last updated, Version 2) angegebenen Aminosäuresequenz. Die Nucleinsäuremoleküle und Aminosäuresequenzen codierend ein R1 Protein aus Kartoffel (GenBank Acc.: Y09533) ist durch Nennung der Referenzen ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

10

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

15

Bei den zur genetischen Modifikation in die Pflanzenzelle oder Pflanze eingebrachten fremden Nucleinsäuremolekülen kann es sich um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Es kann sich daher sowohl um Nucleinsäuremoleküle handeln, die OK 1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen und R1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen enthalten, als auch um Nucleinsäuremoleküle bei denen die OK 1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen und die R1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen auf verschiedenen Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen können beispielsweise in einem Vektor, Plasmid oder linearen Nucleinsäuremolekül gleichzeitig enthalten sein, oder aber Bestandteile von zwei jeweils voneinander getrennten Vektoren, Plasmiden oder linearen Nucleinsäuremolekülen sein.

20

25

Liegen die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen in zwei voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vor, so können sie entweder zeitgleich („Cotransformation“) oder auch nacheinander, d.h. zeitlich aufeinander folgend („Supertransformation“) in

30

das Genom der Pflanzenzelle oder Pflanze eingeführt werden. Die voneinander getrennten Nukleinsäuremoleküle können auch in verschiedene individuelle Pflanzenzellen oder Pflanzen einer Spezies eingeführt werden. Es können dadurch Pflanzenzellen oder Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität von entweder

5 mindestens einem OK1 Protein oder aber mindestens einem R1 Protein erhöht ist. Solche Pflanzen können dann durch anschließendes Kreuzen der Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit solchen, bei welchen die Aktivität eines R1 Proteins erhöht ist, hergestellt werden.

- 10 Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende Mutanten,
- 15 als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. T-DNA-activation-tagging, Transposon-activation tagging, *in situ* activation, *in vivo*- Mutagenese) erzeugt wurden.

- Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können daher
- 20 auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, hergestellt werden. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der
- 25 Aktivität eines OK1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, hergestellt werden.

- Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch erzeugt werden, indem eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden
- 30 Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, kreuzt. Ebenso ist es möglich, erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen zu erzeugen, indem man eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines R1

Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, kreuzt.

- Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von
- 5 Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.
- 10 Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-
- 15 Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

- Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium* Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science
- 20 in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48;
- 25 Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128,
- 30 EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im  
5 Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins genetisch modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes  
10 Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen  
15 Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen  
20 vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen  
25 Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

30 Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist ein



eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR

- 5 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise  
10 enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

- Ist ein eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die  
15 Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise  
20 Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

- In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene  
25 Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein ausgewählt ist, aus der  
30 Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;

- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein

OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurden nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet werden kann, aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.

Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von

(degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology

5 Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen.

Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken

10 enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die

15 Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

20 Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um

25 weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein

30 OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise

unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrock et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

5 Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

10 T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

Waschtemperatur: T=65 bis 68°C.

15 Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza*.  
.. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren,  
20 können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrock et al., 1989, Molecular  
25 Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als  
30 Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der

eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird

die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAPOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

30

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen,

- besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.
- 15 Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.
- 25 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.



In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 17 angegebenen Aminosäuresequenz codieren,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 16 dargestellte  
10 Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- c) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder b) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht;
- d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder b) beschriebenen  
15 Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen und
- e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (T-DNA activation tagging);  
25
- b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (Transposon activation tagging);
- c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren und mit  
30 regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen,

d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.

e) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen R1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines R1 Protein codierenden Gens bewirkt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der sogenannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein und/oder ein codierend ein R1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-

5 DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.

Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA)  
10 zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des  
15 so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthese-Enhancers.

20

Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines  
25 R1 Proteins führt.

Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der  
30 Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein und/oder R1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-  
10 Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der  
15 Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der  
20 Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der  
25 HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985),  
30 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei

Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679;

5 Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen.

10 Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der

15 Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete

20 Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.

Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße  
25 Pflanzen mittels der so genannten "in situ-Aktivierung", hergestellt werden. Die eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene und/oder R1 Gene, was zu einer verstärkten Expression von OK1 Genen und/oder R1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens durch „in vivo“

30 Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen eines endogenen OK1 Gens und/oder eines R1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte

Mutation in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer erhöhten Expression eines OK1 Gens und/oder R1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem Promotor oder einer „enhancer“-  
5 Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene und/oder R1 Gene in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht exprimiert werden.

10 Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein, vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

15 Unter dem Begriff „R1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein R1 Protein, vorzugsweise ein R1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

20 Bei der so genannten "in vivo-Mutagenese" wird durch Transformation von Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic  
25 Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer  
30 Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1

Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann  
5 die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden  
10 Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen  
15 und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen  
20 synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat und/oder der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

25

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines Enzyms mit der Funktion eines OK1  
30 Proteins oder durch die Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das ein OK1 Protein codiert, zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken ist nun durch die Bereitstellung von Enzymen mit der Funktion von OK1 Proteinen und der Bereitstellung von  
5 Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, durch die vorliegende Erfindung möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im  
10 Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber  
15 nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die  
20 einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden  
25 Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei



Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

5

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat einer Stärke zu der Summe aus dem in C-3-Position und  
10 in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) der betreffenden Stärke beiträgt.

Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185)  
15 beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

20 Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder  
25 beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

30 In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine stärke-speichernde Pflanze.

Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

5

Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

- 10 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum*  
15 hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

- Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders  
20 bevorzugt *Zea mais*.

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße stärke-speichernde Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.  
25

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

- Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die  
30 geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst

beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.
- 10 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin
  - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-  
15 Pflanzenzellen führt;
  - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
  - c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
- 20 Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins führt. Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, edt. by  
25 R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge,  
30 Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften

miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erzeugt werden, die in Schritt a) eingeführte Modifikation aufweisen.

5 Die genetischen Modifikationen zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können gleichzeitig oder in aufeinander folgenden Schritten erfolgen. Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führen. Es kann sowohl von Wildtyp-Pflanzen bzw. Wildtyp-  
10 Pflanzenzellen ausgegangen werden, in denen noch keine vorherige genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins erfolgt ist, oder von bereits genetisch modifizierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, in denen bereits durch eine genetische Modifikation die Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins  
15 erhöht ist. Es ist unerheblich, ob für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins führt, die gleiche Methode verwendet wird wie für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines R1 Proteins führt, solange beide genetische Modifikationen zusammen zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in derselben Pflanzenzelle führen.

20

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein  
25 oder die Expression des/der fremden Nucleinsäuremoleküls/Nukleinsäuremoleküle zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in der Zelle führt/führen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
30 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung von mindestens einem fremden Nucleinsäuremolekül in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das/die fremde/fremden

Nucleinsäuremolekül/Nukleinsäuremoleküle ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codierende Sequenzen enthalten.

Wie oben bereits für zur genetischen Modifikation in die Pflanzeszelle oder Pflanze  
5 eingebrachten fremden Nukleinsäuremolekülen beschrieben, kann es sich in Schritt  
a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen  
genetisch modifizierten Pflanze um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um  
mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Die oben gemachten Ausführungen sind für  
das hier beschriebene erfindungsgemäße Verfahren entsprechend anzuwenden.

10

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die  
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung eines fremden  
Nucleinsäuremoleküls, welches mindestens eine ein R1 Protein codierende Sequenz  
15 und mindestens eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die  
genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung mehrerer  
20 fremder Nucleinsäuremoleküle, wobei mindestens ein erstes Nucleinsäuremolekül  
eine ein R1 Protein codierende Sequenz enthält und mindestens ein zweites  
Nucleinsäuremolekül eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls bei der  
25 Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle  
bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch  
auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine  
erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Die weiter oben  
gemachten Angaben zur Verwendung von Mutanten für die Herstellung  
30 erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder Pflanzen, sind hier entsprechend  
anzuwenden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, ist mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 10 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der  
15 Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-  
20 pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten  
25 Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate  
30 der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, codiert mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Reis, Mais, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis*. Referenzen für die genannten Nucleinsäuresequenzen codierend R1 Proteine aus den genannten Pflanzen sind bereits weiter oben angegeben.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- 10 a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- 15 d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanz gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

20

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- 25 b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanze gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

30

Dabei können die Pflanzen nach Schritt a) wie bereits oben beschrieben, genetisch modifiziert werden. Die Regeneration von Pflanzen nach Schritt b) und die Erzeugung weiterer Pflanzen nach Schritt c) wurden ebenfalls bereits weiter oben  
5 dargestellt.

Eine Pflanze, die nach Schritt d) der beiden letztgenannten Ausführungsformen mit Pflanzen oder Nachkommen der Pflanzen, erhalten aus Schritt b) oder c), gekreuzt wird, kann jede Pflanze sein, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen. Die  
10 Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins kann dabei durch jede Modifikation hervorgerufen sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität der betreffenden Proteine in den entsprechenden Pflanzen führt. Es kann sich bei diesen Pflanzen um Mutanten oder mittels gentechnischer Methoden modifizierte Pflanzen handeln. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende  
15 Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. Transposon activation tagging, T-DNA activation tagging, *in vivo*-Mutagenese) erzeugt wurden. Bevorzugt handelt es sich bei den durch gentechnische Verfahren erzeugten Pflanzen um mittels Insertionsmutagenese  
20 hergestellte Mutanten, besonders bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, die ein fremdes Nucleinsäuremolekül exprimieren, insbesondere bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, bei welchen das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein bzw. ein R1 Protein codiert.

25 In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur  
30 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.



In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-  
5 Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt  
10 an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren  
15 die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat  
20 aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

25 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßer Stärken  
30 verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften. Erfindungsgemäße Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der

Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen, 5 beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B. Tinte, Druckfarben etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus 10 erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärke-speichernden Pflanzen, bevorzugt 15 aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer 20 erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der 25 kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden 30 Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben, z. B. in *Starch: Chemistry and Technology* (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall

(1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z.B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und  
5 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von  
10 milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der  
15 vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein  
20 Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden  
30 Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem erntebaren Pflanzenteilen,

erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

5 Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert  
10 werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, da sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen  
15 Gruppen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

20

Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

25

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

30 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-

Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

5 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

15 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.

20 Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

25

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30 Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen, die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließend Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der

(systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

5 Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden. Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

10 Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke, die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßigem  
20 erntebarem Material.

Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den  
25 Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

30 Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Teile einer Pflanze verstanden werden, die als Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von

Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten, Samen oder Körner.

5 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßigem erntebarem Material vor dem Mahlen.

10 Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B. aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder  
15 von erfindungsgemäßigem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine Prozessierung im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinne der vorliegenden Erfindung dar.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des Mahlgutes.

Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B. verschiedene Typenmehle herzustellen.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder  
30 erfindungsgemäßigem erntebarem Material zur Herstellung von Mehlen.



Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu stellen. Die zur Verfügung gestellten DNA Moleküle beinhalten Nucleinsäuresequenzen, welche ein OK1 Protein codieren. Ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins war dem Fachmann bisher nicht bekannt. Daher konnten auch keine DNA Moleküle zur Verfügung gestellt werden, die es erlauben, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen und die von ihnen synthetisierte Stärke bzw. die aus ihnen gewonnenen Mehle zu erzeugen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches sowohl Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein, als auch Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, enthält und bei welchem die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und ein R1 Protein in einer Anordnung vorliegen, wie sie natürlicherweise im Genom eines Organismus nicht vorliegen. Neben Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein kann das rekombinante Nucleinsäuremolekül noch zusätzliche Sequenzen enthalten, welche natürlicherweise nicht in einer solchen Anordnung vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale, Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in Stärke speicherndem pflanzlichem Gewebe aktiv

sind. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe 5 z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5<sup>th</sup> edition (2002), ISBN: 0471250929).

10 Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung betreffen Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

15

In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation 20 bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-Orientierung vorliegen. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle können dabei gemeinsam unter der Kontrolle eines einzigen regulatorischen Elementes stehen, oder sie können jeweils ein eigenes 25 regulatorisches Element aufweisen.

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces* 30 *cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in Methods in Enzymology 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

15 Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem  
20 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen.

25 Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

30 Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um

Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül, oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Bevorzugt sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Wirtszelle.
- 15 Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine

20 Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein bzw. codierend ein R1 Protein können dabei zusammen auf einem einzigen Nucleinsäuremolekül, oder auf voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vorliegen.

- 25 Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen, bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen
- 30 codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung von Nucleinsäuremolekülen in eine Wirtszelle

geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

- Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft
- 5 Zusammensetzungen enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen zusätzlich zu Pflanzenzellen und synthetischem Kulturmedium
- 10 auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

- Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von
- 15 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

- Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer
- 20 Zusammensetzungen zur Transformation von Pflanzenzellen.

### Beschreibung der Sequenzen

- SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-T und OK1-pDEST™17 und inseriert.
- 5 SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50
- 10 inseriert.
- SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1
- 15 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, und *Oryza sativa*.
- SEQ ID NO 6: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines C.r.-R1 Proteins aus *Citrus reticulata*.
- SEQ ID NO 7: Aminosäuresequenz codierend ein C.r.-R1 Protein aus *Citrus reticulata*.
- 20 SEQ ID NO 8: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-R1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 9: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-R1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 10: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines
- 25 S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum*.
- SEQ ID NO 11: Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-R1 Protein aus *Solanum tuberosum*.
- SEQ ID NO 12: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-R1 Proteins aus *Oryza sativa*.
- 30 SEQ ID NO 13: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-R1 Protein aus *Oryza sativa*

SEQ ID NO 14: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines G.m.-R1 Proteins aus *Glycine max*.

SEQ ID NO 15: Aminosäuresequenz codierend das S.t.-R1 Protein aus *Glycine max*.

5 SEQ ID NO 16: Nucleinsäuresequenz enthaltend eine codierende Region eines Z.m.-R1 Proteins aus *Zea mays*.

SEQ ID NO 17: Aminosäuresequenz codierend ein Z.m.-R1 Protein aus *Zea mays*.

10

### Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

25

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7

30

(nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an <sup>33</sup>P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit <sup>33</sup>P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. ). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit <sup>33</sup>P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene



Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP oder randomisiertes  $^{33}\text{P}$  ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

## Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen

konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher  
5 Weise ausführen kann.

## **1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben**

### **a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben**

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und  
10 daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten  
15 Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

### **b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine**

20 Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren  
25 inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

### **c) Entsalzen der ausgefällten Proteine**

30 Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex

G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal  
5 jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

10 Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (**Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254**).

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

	Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
15		1 mM	EDTA
		2 mM	Dithioerythritol (DTE)
		2 mM	Benzamidin
		2 mM	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
		0.5 mM	PMSF
20		0.02 %	Triton X-100

## 2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert  
25 und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100  $\mu$ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

30

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 µm, 30 µm, 20 µm) gegeben.

- 5 Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

10

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15

15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

- 20 Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor
- 25 allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

- Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine
- 30 Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine  
5 Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem  
10 Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche  
15 verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

20

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0  
0.2 mM EDTA  
0.5 % Triton X-100

25

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

30 a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus **sechs** direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

30

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm  
5 eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (*lacZ*) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das  
10 gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten  
15 nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend  
20 jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD<sub>600</sub>) von ca. 0,8 inkubiert.

25 Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 der in Hauptkultur der  
30 betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor

die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

#### 4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

- 5 a)     Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen  
Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW  
10 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird  
15 durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

- b)     Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins  
Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe  
20 von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule  
25 wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der  
30 entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden



anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.

- 5 Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

10 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

- 15 1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

- 20 300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

- 25 300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

- 30 300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

## 5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

## 6. Reinigung eines R1 Proteins

Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

## 7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

### a) *In vitro* Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschritte finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschritt erfolgt eine

Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

5	R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH,	pH	7,5
		1 mM	EDTA		
		6 mM	MgCl <sub>2</sub>		
		0,5 mM	ATP		

10 Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke**

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-

15 Stärke-Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit

20 Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen

25 werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je

30 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer

Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer:	187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
20	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	DTE (frisch zusetzen!)

25 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

## **9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden**

30 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung

gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein  
5 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

## 10 10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und  
15 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte  
20 Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

25 Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF  
30 analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine

bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix ( $\epsilon$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker Reflex™ II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte  $\alpha$ -1,4-Glucose binden und/oder P- $\alpha$ -1,4-Glucose als Substrat benötigen.

#### 11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

- a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke
- Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (**0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke**) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.
- Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke  
5 und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf des Vorliegen von  
radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige  
Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail  
(z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines  
10 Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN  
COULTER™) analysiert.

c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden  
Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-  
15 phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann  
durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von  
Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-  
Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können  
auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-  
20 phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert  
werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere  
Phosphorylierungsreaktion benötigen.

d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

25 Phosphorylierungs-Puffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7,5

1 mM EDTA

6 mM MgCl<sub>2</sub>

0,01 bis 0,5 mM ATP

30 0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes <sup>33</sup>P-ATP (alternativ kann auch ATP  
eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten  
Phosphatrest enthält)

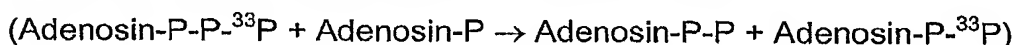


Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

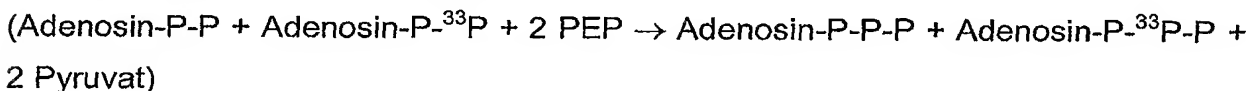
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:



Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils  $\beta^{33}\text{P-ATP}$  und etwas  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$ .

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100  $\mu\text{Ci}$ , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), wird mit 2  $\mu\text{l}$  Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90  $\mu\text{l}$  Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

#### 10 Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

#### iv) Verwendete Puffer

15	Pyruvatkinasepuffer:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA

	Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA
20		10 %	Glycerol
		5 mM	MgCl <sub>2</sub>
		5 mM	KCl
		0,1 mM	ATP
		0,3 mM	AMP

25

### 12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend

wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

**13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden**

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

**a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane**

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B.

- 5 Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex
- 10 Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende
- 15 Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
20	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
	Stop des Laufes		

- Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von
- 25 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die
- 30 Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen

Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

- 10 Eluent C: 100 mM NaOH  
Eluent D: 100 mM NaOH  
500 mM Natriumacetat

**14. Transformation von Reispflanzen**

- 15 Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

**15. Transformation von Weizenpflanzen**

- Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.
- 20

**16. Transformation von Maispflanzen**

Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.

25

**17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat**

a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg

Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

10

b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

20

c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Auftrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

## Beispiele

- 5    1.    **Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist**
- a)    Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*  
Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (**Frischgewicht**) von *Arabidopsis*  
10    *thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden  
beschriebenen Verfahren hergestellt.
- b)    Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*  
15    Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3*  
Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden  
beschriebenen Verfahren isoliert.
- c)    *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von  
20    *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein  
Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von  
*Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden  
beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und  
gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und  
25    zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-  
7171) beschriebenen Verfahren verwendet.
- d)    Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke  
binden  
30    Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem  
Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke

nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-

- 5 Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

- 10 In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

- 15 e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und

- 20 anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

25

- f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie  
30 unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in



Datenbanken (Mascot: [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html); ProFound: [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe); PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch  
5 für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass  
10 diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der  
15 Datenbank vorliegt (Acc.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

## **2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert**

Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA,  
20 isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den  
25 Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,  
30 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

5 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

10 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1<sup>st</sup> Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

15 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

20 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C) (30 s), 68°C (

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

25 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend

30 erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen. Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit

des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

### **3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins**

- 5 Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch
- 10 sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide,
- 15 die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren,
- 20 codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

### **4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in E. coli**

- 25 Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung diese Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer
- 30 Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe

Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer  
5 Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

10

#### 5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

15

#### 6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein,  
20 in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer **enthaltend 0,05 mM** radioaktiv (<sup>33</sup>P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei  
25 Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.  
Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen  
30 A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht

(siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

5

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substart benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substart von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

15

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

20

## 7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem

5 ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5

10 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und

15 mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

20 In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei

25 diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des

30 Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein

gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der

Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

**8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke**

a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-

OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP (ca.  $2,5 \times 10^6$  cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER<sup>TM</sup>) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

b) Totalhydrolyse der P-Stärke



Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H<sub>2</sub>O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

	Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
25	Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

#### c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben zur Auftrennung der filtrierte Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

5    Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach  
10    Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml  
15    Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion		
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)	B
Fr 13	8,7	3,3	
Fr 14	13,1	32,2	
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8	
Fr 16	399,8	112,3	
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6	
Fr 18	196,7	17,3	
Fr 19	6,7	18,9	
Summe	2581,5	2938,3	
Auftrag	3000,0	3000,0	
Wiederfindung	86,0%	97,9%	

**Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der

10 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat

15 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

## 9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt.

- 5 Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ
- 10 ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-
- 15 OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

- 20 Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

- 25 1. Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os\_ok1-F6 (AAAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.
- 30 2. Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser

- Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os\_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120 bezeichnet.
- 5
3. Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os\_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.
- 10
4. Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os\_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML119 bezeichnet.
- 15
- 20
5. Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os\_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.
- 25
- 30 Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

5 Ein 960 Basenpaare langes Fragement enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os\_ok1-F4 (s. o.) und Os\_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os\_ok1-F6 und Os\_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
10 Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *Xho*I-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os\_ok1-F3 (s. o.) und Os\_ok1-R2Xho (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
15 Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Pst*I erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

20 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Xho*I aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

25 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Afl*II/*Not*I aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen  
30 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Nar*I aus dem

Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

5

#### **10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt**

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die

10 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro

15 Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

20

#### **11. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung eines Konstruktes zur Transformation von Maispflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

25 Als Ausgangsplasmid zur Herstellung eines Plasmides, welches zur Transformation von Maispflanzen verwendet wurde, diente das Plasmid pMZ12. Dieses Plasmid enthält den *ColE1* Origen des Plasmides pBR322 ) Bolivar et al, 1977, Gene 2, 95-113) und einen bakteriellen Selektionsmarker, der eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Gentamycin vermittelt (Wohlleben et al., 1989, MGG 217, 202-208).

30 Weiterhin enthält dieses Plasmid eine rechte und eine linke T-DNA Border Sequenz.

Zwischen diesen T-DNA Border Sequenzen enthält das Plasmid ein *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (White et al., 1990, NAR 18, 1062; EMBL Acc.: X17220), welches Resistenz gegenüber dem Herbizid Glufosinat vermittelt. Die Expression des *bar* Gens wird durch den Promotor des *actin* gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) initiiert. Zur Stabilisierung der Expression des *bar* Gens ist zwischen dem *actin* Promotor und der das *bar* Protein codierenden Sequenz das 1. Intron des *actin* Gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) eingefügt. Nach der das *bar* Protein codierenden Sequenz folgt das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573).

In das Plasmid pMZ12 wurde der Ubiquitinpromotor aus *Zae mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt vom 1. Intron des Ubiquitin Gens aus *Zea mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt von der codierenden Sequenz des R1 Gens aus *Solanum tuberosum* (siehe SEQ ID NO 10), gefolgt von dem Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573) zwischen die linke und rechte T-DNA Border Sequenz eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pHN3-146 bezeichnet.

20 b) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pHN3-146

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pHN3-146 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

c) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen.

d) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1



Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTTAC) und X2

5 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein  
10 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes HindIII / SphI Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären  
15 Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgens, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

20 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und  
25 Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell  
30 et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987, EMBO J. 6, 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription

und Polyadenylierung. Das bar-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (EMBL Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) wurde als *Pst*I-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sac*I nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis* *thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *Sma*I und *Sac*I geschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.

Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Asp*718I geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *Sda*I nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große Fragment wurde in das mit *Eco*RV und *Pst*I geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

e) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1  
Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pUbi-A.t.-OK1 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

f) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen.

- g) Erzeugung von homozygoten Pflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, wurden Samen der einzelnen Pflanzen geerntet und jeweils ca. 30

- 5 Samen pro Pflanze erneut ausgelegt und im Gewächshaus kultiviert. Pflanzen dieser T1 Generation wurden im Dreiblattstadium mit einer Lösung, enthaltend 0,5% Basta® besprüht. Es wurden nur solche Gruppen von T1 Pflanzen weiterverfolgt, bei welchen ca. 25% der jeweils 30 kultivierten Pflanzen nach Sprühen mit der Basta® Lösung abstarben, da es sich bei diesen Pflanzen um solche handelt, bei welchen
- 10 die Integration der betreffenden T-DNA des Plasmides pHN3-146 oder pUbi-A.t.-OK1 an einem Locus im Genom vorliegt. Aus Blattmaterial von den ca. 75% der Pflanzen, die das Sprühen mit Basta® Lösung überlebten, wurde jeweils genomische DNA isoliert und mittels Invader® Technology (Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177) auf die jeweils vorliegende Kopienzahl hin untersucht. Bei T1 Pflanzen,
- 15 die innerhalb einer Gruppe von Nachkommen einer T0 Pflanze, bei der Analyse mittels Invader® Technologie ein etwa doppelt so starkes Signal ergaben, wie die restlichen Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, sind homozygot bezüglich des Locus, an welchem die T-DNA des betreffenden Plasmides integriert ist. Weisen ca. 30% der Nachkommen einer T0 Pflanze, die die Behandlung mit Basta® Lösung
- 20 überlebt haben ein etwa doppelt so starkes Signal in der Analyse mittels Invader® Technologie auf, im Vergleich zu den restlichen ca.70% der Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, so ist dieses ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich um die Integration der T-DNA an einem einzigen Locus handelt.

- 25 h) Erzeugung von Pflanzen, die sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines S.t.-R1 Proteins aufwiesen und die nach der unter g) beschriebenen Analyse homozygot bezüglich der Integration der T-

- 30 DNA des Plasmides pHN3-146 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, wurden mit T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufwiesen und nach der unter g) beschriebenen Analyse

homozygot bezüglich der Integration der T-DNA des Plasmides pUbi-A.t.-OK1 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen weisen sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins auf.

- i) Analyse der Körner von transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus den unter h) beschriebenen Kreuzungen hervorgegangenen Körnern der betreffenden Mais Pflanzen wurde Stärke isoliert. Die Stärke aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen.

Stärke, isoliert aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt ebenfalls mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus Pflanzen, die nur eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder nur eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

## **12. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

- a) Herstellung von transgenen Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Die Herstellung von Weizenpflanzen, welche eine erhöhte Expression des R1 Proteins von Kartoffel aufweisen, wurde in WO 02 34923 beschrieben. Die dort beschriebenen Pflanzen wurden teilweise als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen, eingesetzt.

- b) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen, die ein OK1 Protein überexprimieren

pMCS5 (Mobitec, [www.mobitec.de](http://www.mobitec.de)) wurde mit *Bgl*III und *Bam*HI verdaut und religiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.

Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9  
5 (ACTTCTgCAgCggCCgCgATCgTTCAAACATTTggCAATAAAgTTTC) und P10 (TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAgATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)

amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *Hind*III und *Pst*I verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-*nos* bezeichnet. In diesen Vektor  
10 wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) und dem durch Verdau mit *Cla*I und Religation verkürzten ersten Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet.

15 In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit *Bsp*120/*Not*I aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in sense Orientierung in die *Not*I-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *Avr*II  
20 und *Swa*I ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

25 c) Herstellung eines Plasmides zur Erzeugung von Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Es wurde ein Plasmid hergestellt indem das DNA-Fragment welches für das vollständige R1-Protein aus Kartoffel codiert, zwischen zwei Erkennungsschnittstellen für das Restriktionsenzym *Pac*I liegt. Dazu wurde die  
30 *Multiple Cloning Site* aus dem Plasmid pBluescript II SK+ mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und den beiden Oligonukleotiden MCS1-1 (TTTTTGCGCGCGTTAATTAACGACTCACTATAGGGCGA) und MCS1-2

(TTTTTGCGCGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG) amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *BssHII* nachgeschnitten und in den mit *BssHII* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBluescript II SK+ (Invitrogen) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-Pac bezeichnet.

- 5 In den Vektor pSK-Pac wurde ein *NotI*-Fragment kloniert, welches aus dem Klon pRL2 (WO 9711188) erhalten wurde. Das *NotI* Fragment enthält das vollständige offene Leseraster für das R1-Protein aus Kartoffel. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR1 bezeichnet.

- 10 Aus pSK-ubq (siehe oben) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *SmaI* ein Fragment herausgeschnitten, welches den Ubiquitin-Promoter und das verkürzte erste Intron enthielt und in die *EcoRV*-Schnittstelle des Plasmids pIR96 kloniert. In das erhaltene Plasmid wurde in sense Orientierung zum Promoter ein *PacI*-Fragment aus pIR1 kloniert, welches das vollständige offene Leseraster kodierend für das R1-Protein aus Kartoffel enthält. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML82 bezeichnet.

15

- d) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem OK1 Protein

- Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit aus einem Agarosegel ausgeschnittenen Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, zusammen mit dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-OK1 bezeichnet.
- 20
- 25

- e) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem R1 Protein
- Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit dem Plasmid pML82 mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1 bezeichnet.
- 30

- f) Cotransformation von Weizenpflanzen zur Überexpression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem DNA Gemisch, enthaltend das Plasmid pML82 und ein mittels HPLC gereinigtes Fragment, welches mit den  
5 Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode  
10 transformiert. Mit Hilfe von RT-PCR wurden Pflanzen identifiziert, die sowohl eine Expression des A.t.-Ok1 Proteins, als auch eine Expression des S.t.-R1 Proteins aufwiesen. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1-OK1 bezeichnet.

- g) Identifizierung von transgenen Weizenpflanzen

15 T1 Pflanzen der Linien TA-R1 und TA-OK1 wurden im Gewächshaus kultiviert und vor der Blüte mit Basta® (0,5%ige Lösung) besprüht. Pflanzen, die das Basta® vermittelnde Resistenzgen nicht exprimieren starben ab.

h) Herstellung von Weizenpflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins  
20 und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung TA-OK1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten, wurden entweder mit TA-R1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten oder mit homozygoten Pflanzen der in WO 02 034923 beschriebenen Linie 40A-11-8 gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit TA-Ok1xTA-R1 bzw. mit TA-OK1x40A-11-8  
25 bezeichnet.

- e) Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus durch Kreuzungen der Linien TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und 40A-11-8  
30 hervorgegangenen Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und

40A-11-8 isoliert wurde, war bei einigen Pflanzen deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linie 40A-11-8 isoliert wurde.

Für die Analyse der Stärke aus verschiedenen TA-R1-OK1 Linien wurden Körner der jeweiligen Pflanzen geerntet und der C-6-Phosphatgehalt und der C-3-Phosphatgehalt der isolierten Stärke analysiert. Es konnten einige Pflanzen identifiziert werden, bei welchen der Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat deutlich erhöht war im Vergleich zu dem Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat von Stärke, isoliert aus Körnern der Linien TA-R1 oder 40A-11-8.

10

### **13. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

#### **a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1**

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit den Primern glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und



Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA  
5 Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),  
10 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-  
15 Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

20 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich  
25 des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM  
30 herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *SaII* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment

kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl*136II und *Xho*I geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plamid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

5 b) Transformation von Reispflanzen mit dem Plamid pGlo-A.t.-OK1

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plamid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

10 c) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plamid pGlo-A.t.-OK1 transformiert wurden

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand

15 von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-OK1 bezeichnet.

d) Transformation von Reispflanzen mit dem Plamid pML82

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plamid pML82) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

e) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plamid pGloML82 transformiert wurden

25 Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-R1 bezeichnet.

30

f) Herstellung von Reispflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung.

Homozygote OS-OK1 Pflanzen wurden entweder mit homozygoten OS-R1 Pflanzen, gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit OS-Ok1xOS-R1 bezeichnet.

- g) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke
- 5 Aus den durch Kreuzungen hervorgegangenen OS-Ok1xOS-R1 Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen der Linien OS-Ok1 und OS-R1 isoliert wurde, war bei einigen Linien deutlich höher, als
- 10 bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linien OS-R1 isoliert wurde.

## Patentansprüche

EPC-DEPLIN

05-03-2004

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls, in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4 oder 5, wobei besagtes fremdes, ein R1 Protein codierendes, Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Mais, Reis, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis* codiert.
7. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
8. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 7, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist, im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
9. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 8, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.

10. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Pflanze nach Anspruch 10, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
12. Pflanze nach Anspruch 11, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
14. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
15. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, worin
  - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
  - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
  - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, worin die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle besteht.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, worin die genetisch modifizierte Pflanze im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat aufweist.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
22. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer genetisch modifizierten Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12,.
25. Verwendung von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
26. Modifizierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24.
27. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26 derivatisiert wird.
28. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 27.
29. Verwendung von modifizierter Stärke nach einem der Ansprüche 22 oder 26 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.
30. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26.
31. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, aus Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.

32. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Pflanzenteilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder erntebarem Material nach Anspruch 14.
33. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung von Mehlen.
34. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein und ein Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein.
35. Vektor enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34.
36. Vektor nach Anspruch 35, wobei die rekombinanten Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
37. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
38. Zusammensetzung enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
39. Zusammensetzung enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.
40. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 38 oder 39 zur Transformation von Pflanzenzellen.

EPO-BEILIN  
05-02-2004

BCS 04-5003-EP

## **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.





1 / 5

EPO-BERLIN

05-03-2004

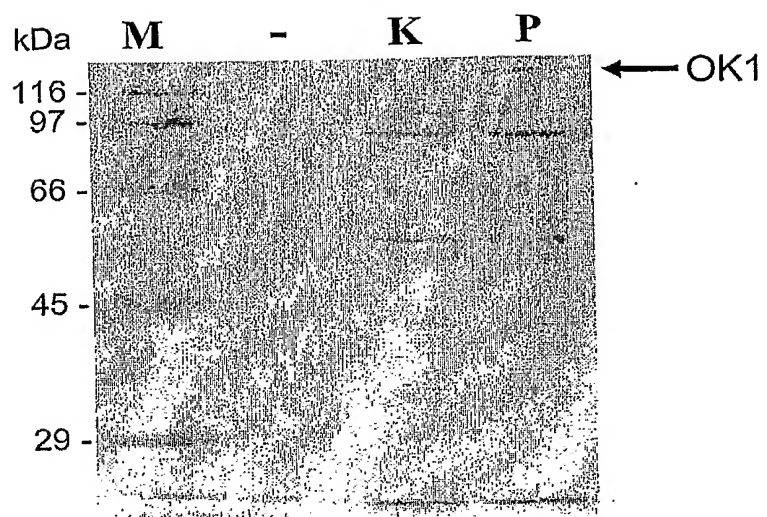


Fig. 1

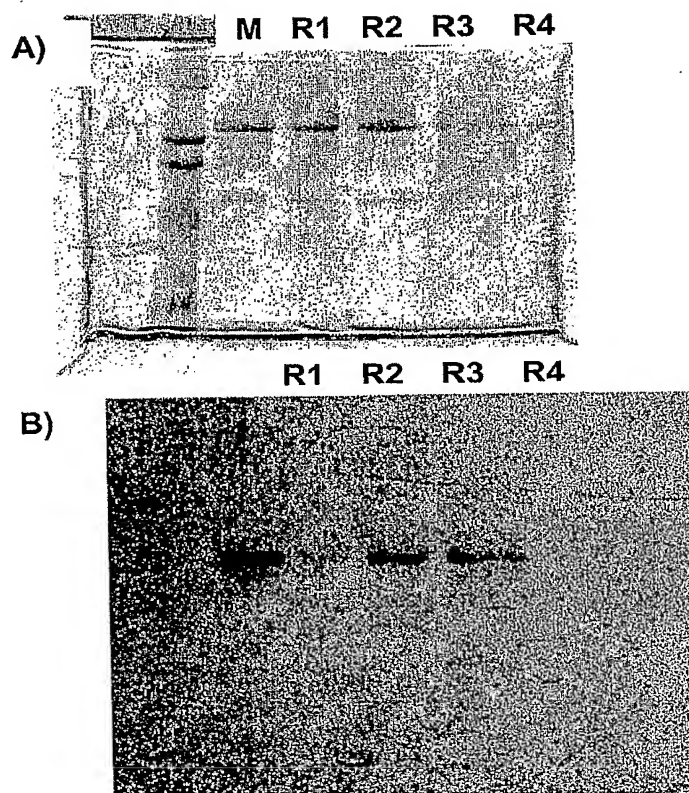


Fig. 2

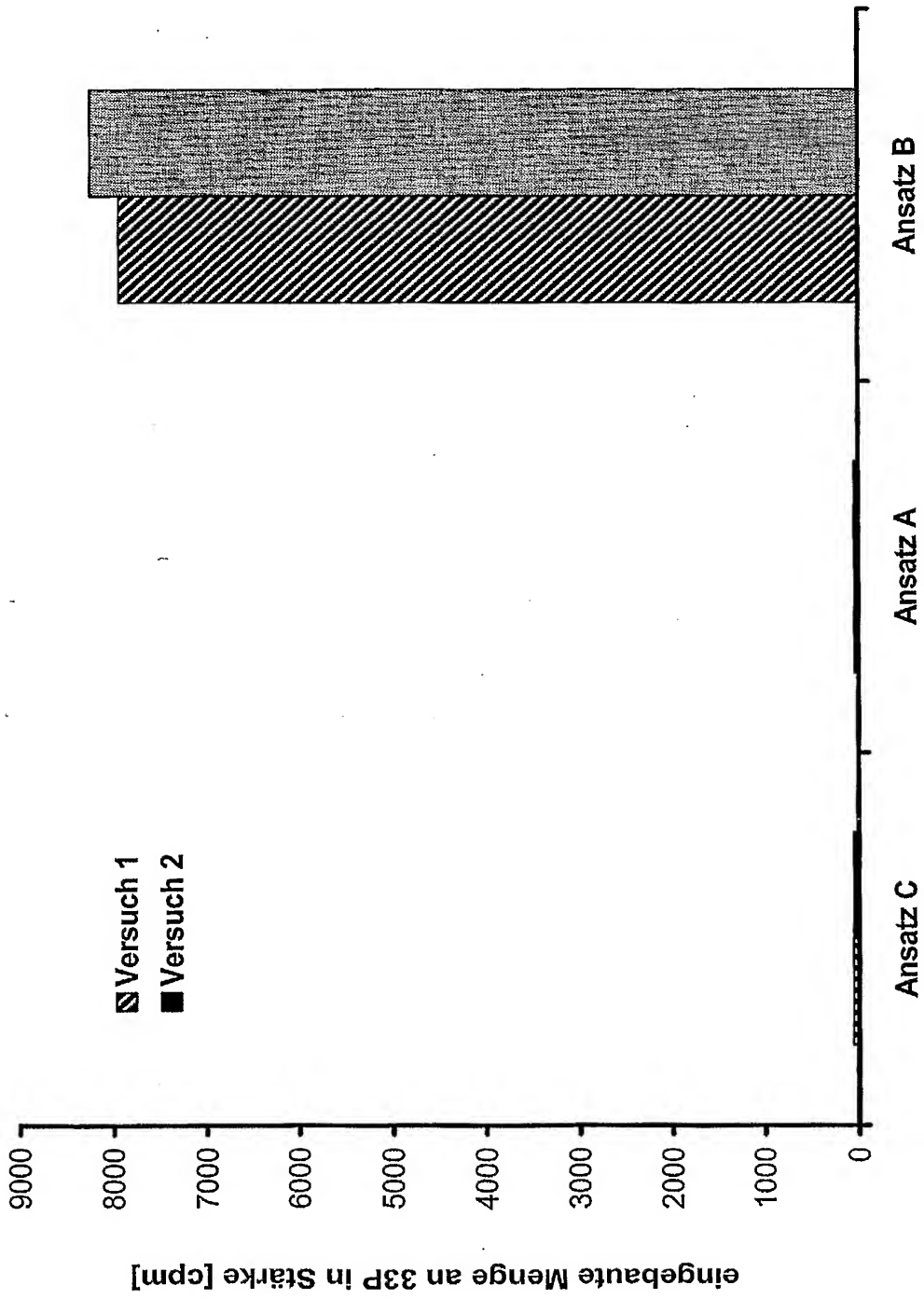


Fig.: 3

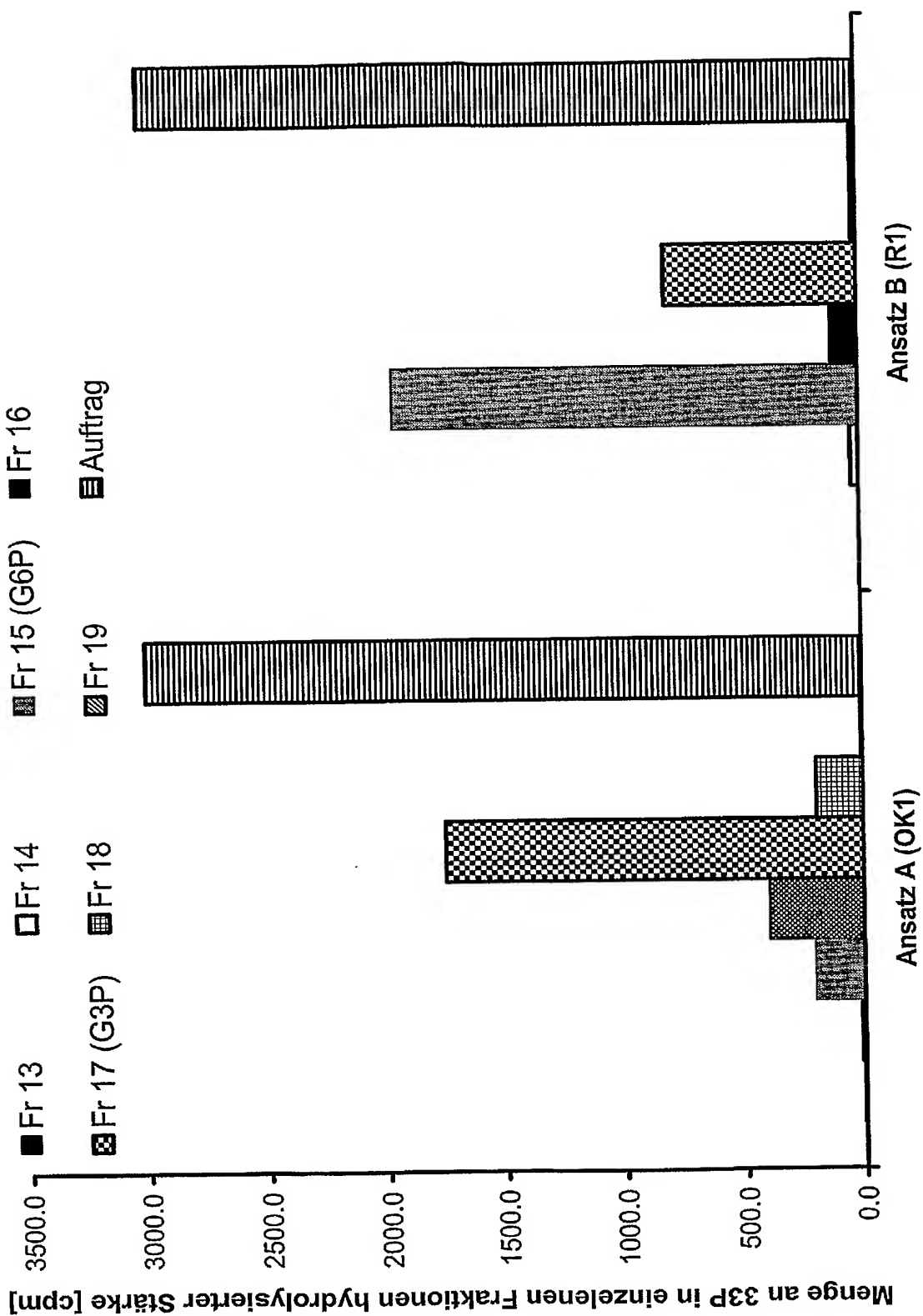


Fig. 4

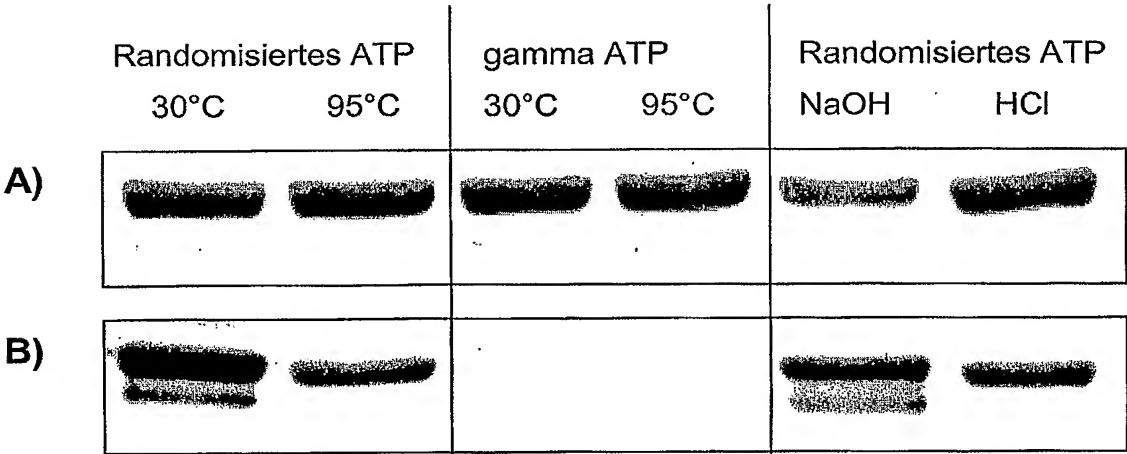


Fig. 5

5 / 5

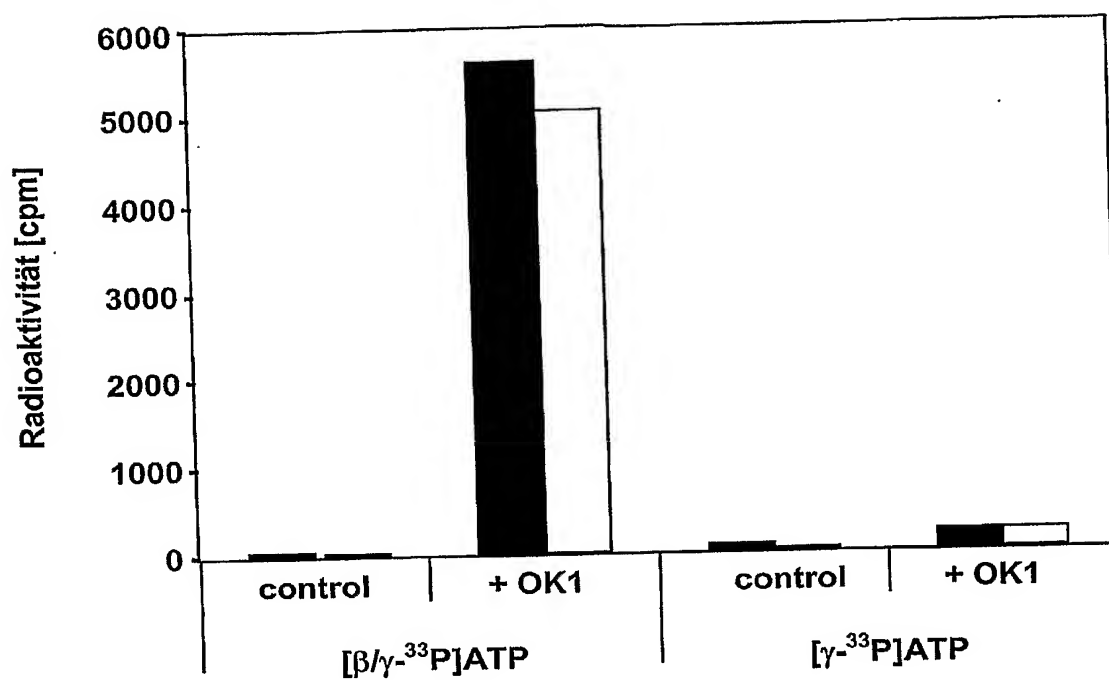


Fig. 6



BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
SEQUENCE LISTING

EPO-DE-ILN

0 5 -03- 2004

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

<130> BCS 04-5003-EP

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1	
atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	
act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	
aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	
cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	
aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	
gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	
85 90 95	



aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu 100 105 110	336
aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu 115 120 125	384
tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser 130 135 140	432
ggt gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Ser Gly Asn Phe Ser Val 145 150 155 160	480
gtt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu 165 170 175	528
gtt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn 180 185 190	576
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln 195 200 205	624
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser 210 215 220	672
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp 225 230 235 240	720
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp 245 250 255	768
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val 260 265 270	816
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr 275 280 285	864
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe 290 295 300	912
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg 305 310 315 320	960
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr 325 330 335	1008
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser 340 345 350	1056
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp 355 360 365	1104

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ata Ile	gcc Ala	cat His	cgg Arg	aat Asn	gat Asp	att Ile	cct Pro	cat His	gat Asp	ctc Leu	aag Lys	caa Gln	gaa Glu	atc Ile	aag Lys	1152
370						375					380					
cat His	acg Thr	ata Ile	caa Gln	aat Asn	aag Lys	ctt Leu	cac His	cgg Arg	aat Asn	gct Ala	ggt Gly	cca Pro	gaa Glu	gat Asp	cta Leu	1200
385					390					395					400	
att Ile	gca Ala	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	atg Met	ctt Leu	caa Gln	cga Arg	att Ile	acc Thr	gag Glu	acc Thr	cca Pro	gga Gly	aaa Lys	1248
				405					410					415		
tat Tyr	agt Ser	gga Gly	gac Asp	ttt Phe	gtg Val	gag Glu	cag Gln	ttt Phe	aaa Lys	ata Ile	ttc Phe	cat His	aat Asn	gag Glu	ctt Leu	1296
			420					425					430			
aaa Lys	gat Asp	ttc Phe	ttt Phe	aat Asn	gct Ala	gga Gly	agt Ser	ctc Leu	act Thr	gaa Glu	cag Gln	ctt Leu	gat Asp	tct Ser	atg Met	1344
		435					440					445				
aaa Lys	att Ile	tct Ser	atg Met	gat Asp	gat Asp	aga Arg	ggt Gly	ctt Leu	tct Ser	gcg Ala	ctc Leu	aat Asn	ttg Leu	ttt Phe	ttt Phe	1392
	450					455					460					
gaa Glu	tgt Cys	aaa Lys	aag Lys	cgc Arg	ctt Leu	gac Asp	aca Thr	tca Ser	gga Gly	gaa Glu	tca Ser	agc Ser	aat Asn	gtt Val	ttg Leu	1440
465					470					475					480	
gag Glu	ttg Leu	att Ile	aaa Lys	acc Thr	atg Met	cat His	tct Ser	cta Leu	gct Ala	tct Ser	tta Leu	aga Arg	gaa Glu	aca Thr	att Ile	1488
				485					490					495		
ata Ile	aag Lys	gaa Glu	ctt Leu	aat Asn	agc Ser	ggc Gly	ttg Leu	cga Arg	aat Asn	gat Asp	gct Ala	cct Pro	gat Asp	act Thr	gcc Ala	1536
			500					505					510			
att Ile	gca Ala	atg Met	cgc Arg	cag Gln	aag Lys	tgg Trp	cgc Arg	ctt Leu	tgt Cys	gag Glu	atc Ile	ggc Gly	ctc Leu	gag Glu	gac Asp	1584
		515					520					525				
tac Tyr	ttt Phe	ttt Phe	gtt Val	cta Leu	cta Leu	agc Ser	aga Arg	ttc Phe	ctc Leu	aat Asn	gct Ala	ctt Leu	gaa Glu	act Thr	atg Met	1632
	530					535					540					
gga Gly	gga Gly	gct Ala	gat Asp	caa Gln	ctg Leu	gca Ala	aaa Lys	gat Asp	gtg Val	gga Gly	tca Ser	aga Arg	aac Asn	gtt Val	gcc Ala	1680
545					550					555					560	
tca Ser	tgg Trp	aat Asn	gat Asp	cca Pro	cta Leu	gat Asp	gct Ala	ttg Leu	gtg Val	ttg Leu	ggt Gly	gtt Val	cac His	caa Gln	gta Val	1728
				565					570					575		
ggt Gly	cta Leu	tct Ser	ggt Gly	tgg Trp	aag Lys	caa Gln	gaa Glu	gaa Glu	tgt Cys	tta Leu	gcc Ala	att Ile	gga Gly	aat Asn	gaa Glu	1776
			580					585					590			
ctc Leu	ctt Leu	gct Ala	tgg Trp	cga Arg	gaa Glu	agg Arg	gac Asp	cta Leu	ctt Leu	gaa Glu	aaa Lys	gaa Glu	ggg Gly	gaa Glu	gag Glu	1824
		595					600					605				
gat Asp	gga Gly	aaa Lys	aca Thr	att Ile	tgg Trp	gcc Ala	atg Met	agg Arg	ctg Leu	aaa Lys	gca Ala	act Thr	ctt Leu	gat Asp	cga Arg	1872
	610					615					620					
gca Ala	cgc Arg	aga Arg	tta Leu	aca Thr	gca Ala	gaa Glu	tat Tyr	tct Ser	gat Asp	ttg Leu	ctt Leu	ctt Leu	caa Gln	ata Ile	ttt Phe	1920
625					630					635					640	

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct Pro	cct Pro	aat Asn	gtg Val	gag Glu 645	att Ile	tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gct Ala 650	cta Leu	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu 655	aat Asn	1968
agt Ser	gtc Val	aag Lys	acc Thr 660	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gag Glu 665	att Ile	cgt Arg	gct Ala	gga Gly	att Ile 670	att Ile	ttc Phe	2016
cag Gln	atc Ile	tca Ser 675	aag Lys	ctc Leu	tgc Cys	act Thr	gtt Val 680	ctt Leu	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	gta Val 685	aga Arg	aat Asn	tca Ser	2064
ctt Leu	ggt Gly 690	tct Ser	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	gat Asp 695	gtc Val	gtt Val	gta Val	cct Pro	gga Gly 700	tgc Ser	acg Thr	tct Ser	ggg Gly	2112
aca Thr 705	tta Leu	gtt Val	cag Gln	gtt Val	gag Glu 710	agc Ser	att Ile	gtt Val	ccg Pro	gga Gly 715	tca Ser	ttg Leu	cca Pro	gca Ala	act Thr 720	2160
tct Ser	ggt Gly	ggt Gly	cct Pro	att Ile 725	att Ile	ctc Leu	ttg Leu	gtc Val	aat Asn 730	aaa Lys	gct Ala	gat Asp	ggc Gly	gat Asp 735	gaa Glu	2208
gag Glu	gta Val	agt Ser	gct Ala 740	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	aac Asn	ata Ile 745	gct Ala	gga Gly	gtc Val	atg Met	ctt Leu 750	ctg Leu	cag Gln	2256
gag Glu	ctg Leu	cct Pro 755	cac His	ttg Leu	tct Ser	cac His	ctt Leu 760	ggc Gly	gtt Val	aga Arg	gcg Ala	cgg Arg 765	cag Gln	gag Glu	aaa Lys	2304
att Ile 770	gtc Val	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	tgt Cys	gat Asp 775	gat Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys	gtt Val 780	gct Ala	gat Asp	ata Ile	cga Arg	2352
cga Arg 785	ctt Leu	gtg Val	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe 790	gtg Val	agg Arg	ttg Leu	gaa Glu	gca Ala 795	tct Ser	cca Pro	agt Ser	cat His	gtg Val 800	2400
aat Asn	ctg Leu	ata Ile	ctt Leu	tca Ser 805	act Thr	gag Glu	ggt Gly	agg Arg	agt Ser 810	cgc Arg	act Thr	tcc Ser	aaa Lys	tcc Ser 815	agt Ser	2448
gcg Ala	acc Thr	aaa Lys	aaa Lys 820	acg Thr	gat Asp	aag Lys	aac Asn	agc Ser 825	tta Leu	tct Ser	aag Lys	aaa Lys	aaa Lys 830	aca Thr	gat Asp	2496
aag Lys	aag Lys	agc Ser 835	tta Leu	tct Ser	atc Ile	gat Asp	gat Asp 840	gaa Glu	gaa Glu	tca Ser	aag Lys	cct Pro 845	ggt Gly	tcc Ser	tca Ser	2544
tct Ser	tcc Ser 850	aat Asn	agc Ser	ctc Leu	ctt Leu	tac Tyr 855	tct Ser	tcc Ser	aag Lys	gat Asp	atc Ile 860	cct Pro	agt Ser	gga Gly	gga Gly	2592
atc Ile 865	ata Ile	gca Ala	ctt Leu	gct Ala	gat Asp 870	gca Ala	gat Asp	gta Val	cca Pro	act Thr 875	tct Ser	ggt Gly	tca Ser	aaa Lys	tct Ser 880	2640
gct Ala	gca Ala	tgt Cys	ggt Gly	ctt Leu 885	ctt Leu	gca Ala	tct Ser	tta Leu	gca Ala 890	gaa Glu	gcc Ala	tct Ser	agt Ser	aaa Lys 895	gtg Val	2688
cac His	agc Ser	gaa Glu	cac His 900	gga Gly	gtt Val	ccg Pro	gca Ala	tca Ser 905	ttt Phe	aag Lys	gtt Val	cca Pro	act Thr 910	gga Gly	gtt Val	2736

gtc	ata	cct	ttt	gga	tcg	atg	gaa	tta	gct	tta	aag	caa	aat	aat	tcg	2784
Val	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	Asn	Asn	Ser	
		915					920					925				
gaa	gaa	aag	ttt	gcg	tct	ttg	cta	gaa	aaa	cta	gaa	acc	gcc	aga	cct	2832
Glu	Glu	Lys	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	
	930					935					940					
gag	ggg	ggg	gag	cta	gac	gac	ata	tgt	gac	cag	atc	cat	gaa	gtg	atg	2880
Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Asp	Ile	Cys	Asp	Gln	Ile	His	Glu	Val	Met	
	945				950					955					960	
aaa	acg	ttg	caa	gtg	cct	aaa	gaa	aca	atc	aac	agc	ata	agc	aaa	gcg	2928
Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	
				965					970					975		
ttt	ctc	aaa	gat	gct	cgt	ctc	att	gtt	cgt	tca	agt	gct	aac	gtc	gag	2976
Phe	Leu	Lys	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	
			980					985					990			
gac	tta	gcc	gga	atg	tca	gct	gca	gga	ctc	tat	gaa	tca	atc	cct	aac	3024
Asp	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Asn	
		995					1000					1005				
gtg	agt	ccc	tcg	gat	cct	ttg	gtg	ttt	tca	gat	tcg	gtt	tgc	caa		3069
Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln		
	1010					1015					1020					
gtt	tgg	gct	tct	ctc	tac	aca	aga	aga	gct	gtt	cta	agc	cgt	aga		3114
Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg		
	1025					1030					1035					
gct	gct	ggg	gtc	tct	caa	aga	gaa	gct	tca	atg	gct	gtt	ctc	gtt		3159
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
	1040					1045					1050					
caa	gaa	atg	ctt	tcg	ccg	gac	tta	tca	ttc	gtt	ctg	cac	aca	gtg		3204
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val		
	1055					1060					1065					
agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct		3249
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala		
	1070					1075					1080					
cct	ggg	tta	ggg	gag	act	tta	gct	tca	gga	aca	aga	gga	aca	cca		3294
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro		
	1085					1090					1095					
tgg	aga	ctc	gct	tcg	ggg	aag	ctc	gac	ggg	att	gta	caa	acc	tta		3339
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu		
	1100					1105					1110					
gct	ttc	gca	aac	ttc	agc	gaa	gag	ctt	ctt	gtg	tca	gga	aca	ggg		3384
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly		
	1115					1120					1125					
cct	gct	gat	gga	aaa	tac	gtt	cgg	ttg	acc	gtg	gac	tat	agc	aaa		3429
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys		
	1130					1135					1140					
aaa	cgt	tta	act	gtt	gac	tcg	gtg	ttt	aga	cag	cag	ctc	ggg	cag		3474
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln		
	1145					1150					1155					
aga	ctc	ggg	tcg	gtt	ggg	ttc	ttc	ttg	gaa	aga	aac	ttt	ggg	tgt		3519
Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Gly	Cys		
	1160					1165					1170					

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att 3564  
Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
1175 1180 1185

gtt cag tca agg cca caa cct ctg tag 3591  
Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
1190 1195

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile  
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His  
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser  
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg  
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu  
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala  
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu  
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu  
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser  
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val  
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu  
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn  
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln  
 195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser  
 210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp  
 225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp  
 245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val  
 260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr  
 275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe  
 290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg  
 305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr  
 325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser  
 340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp  
 355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys  
 370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu  
 385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys  
 405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu  
 420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met  
 435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe  
 450 455 460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu  
 465 470 475 480  
 Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile  
 485 490 495  
 Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala  
 500 505 510  
 Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp  
 515 520 525  
 Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met  
 530 535 540  
 Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala  
 545 550 555 560  
 Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val  
 565 570 575  
 Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu  
 580 585 590  
 Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu  
 595 600 605  
 Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg  
 610 615 620  
 Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe  
 625 630 635 640  
 Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn  
 645 650 655  
 Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe  
 660 665 670  
 Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser  
 675 680 685  
 Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly  
 690 695 700  
 Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr  
 705 710 715 720  
 Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu  
 725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln  
740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys  
755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg  
770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val  
785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser  
805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp  
820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser  
835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly  
850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser  
865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val  
885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val  
900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser  
915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro  
930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met  
945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala  
965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu  
980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn  
995 1000 1005



Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln  
 1010 1015 1020  
 Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg  
 1025 1030 1035  
 Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val  
 1040 1045 1050  
 Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val  
 1055 1060 1065  
 Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala  
 1070 1075 1080  
 Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro  
 1085 1090 1095  
 Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu  
 1100 1105 1110  
 Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly  
 1115 1120 1125  
 Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys  
 1130 1135 1140  
 Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln  
 1145 1150 1155  
 Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys  
 1160 1165 1170  
 Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
 1175 1180 1185  
 Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
 1190 1195

<210> 3

<211> 3644

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (13)..(3633)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata	51
Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile	
1 5 10	
ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt	99
Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Gly Val Gly	
15 20 25	
gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc	147
Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg	
30 35 40 45	
ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca	195
Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr	
50 55 60	
aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc	243
Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu	
65 70 75	
cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att	291
Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile	
80 85 90	
atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg	339
Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu	
95 100 105	
gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa	387
Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu	
110 115 120 125	
aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat	435
Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp	
130 135 140	
aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat	483
Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp	
145 150 155	
ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta	531
Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu	
160 165 170	
gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag	579
Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys	
175 180 185	
aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa	627
Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys	
190 195 200 205	
gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc	675
Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala	
210 215 220	
gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc	723
Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe	
225 230 235	
atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat	771

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Met	Arg	Ser	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg	Met	Trp	Asp	
		240					245					250				
aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819
Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	Ala	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	
	255					260					265					
gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867
Ala	Ser	Arg	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	
	270				275					280					285	
tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915
Ser	Glu	Ser	Phe	Asp	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	
				290					295					300		
gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggg	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys	Phe	Glu	
			305					310					315			
gat	ggg	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011
Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Lys	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	Gln	
		320					325					330				
ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059
Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Met	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	
	335					340					345					
aag	gat	gtt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107
Lys	Asp	Val	Leu	Val	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe	
	350				355					360					365	
aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155
Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	Ile	
				370					375					380		
gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203
Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	His	
			385					390					395			
act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251
Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	
		400					405					410				
gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	tac	1299
Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr	
	415					420					425					
agt	gaa	aca	ttt	gtt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347
Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	
	430				435					440					445	
gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395
Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	
				450					455					460		
gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	gtt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443
Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu	
			465					470					475			
acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491
Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	
		480					485					490				
aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539
Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	
	495					500					505					
cta	aga	tcg	gtt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp  
 510 515 520 525

gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa 1635  
 Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu  
 530 535 540

att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat 1683  
 Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn  
 545 550 555

act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct 1731  
 Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala  
 560 565 570

aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc 1779  
 Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly  
 575 580 585

atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc 1827  
 Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala  
 590 595 600 605

ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt 1875  
 Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser  
 610 615 620

gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct 1923  
 Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala  
 625 630 635

aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt 1971  
 Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu  
 640 645 650

ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga 2019  
 Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly  
 655 660 665

ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct 2067  
 Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala  
 670 675 680 685

ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca 2115  
 Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala  
 690 695 700

att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga 2163  
 Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly  
 705 710 715

gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca 2211  
 Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser  
 720 725 730

tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct 2259  
 Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala  
 735 740 745

gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt 2307  
 Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val  
 750 755 760 765

att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct 2355  
 Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala  
 770 775 780

cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt 2403

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Arg Gln Glu Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val  
 785 790 795

aca gat gtg tat ttg ctt gag gga aaa tat atc aga tta gaa gca tca Thr Asp Val Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser 800 805 810	2451
tcc atc aat gtc aat ctc tca ata gtt tca gaa aaa aat gac aat gct Ser Ile Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala 815 820 825	2499
gtc tct aca gaa cca aat agt aca ggg aat cca ttt caa cag aaa ctc Val Ser Thr Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu 830 835 840 845	2547
caa aat gaa ttc tct cta cca tcg gat atc gag atg cca ctg caa atg Gln Asn Glu Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met 850 855 860	2595
tct aag caa aaa agc aaa tca gga gtg aat ggt agt ttt gct gct ctt Ser Lys Gln Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu 865 870 875	2643
gag ctt tca gaa gct tca gtg gaa tca gct ggt gca aaa gct gct gca Glu Leu Ser Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala 880 885 890	2691
tgc aga act ctt tct gtt ctt gct tca ttg tct aat aaa gtc tat agt Cys Arg Thr Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser 895 900 905	2739
gat caa gga gtt cca gca gcc ttt aga gtc cct tct ggt gct gtg ata Asp Gln Gly Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile 910 915 920 925	2787
cca ttt gga tca atg gag gat gcg ctc aag aaa agt gga tca ctg gaa Pro Phe Gly Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu 930 935 940	2835
tcc ttt aca agc ctt cta gaa aag att gaa aca gcc aaa gtc gaa aat Ser Phe Thr Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn 945 950 955	2883
ggt gaa gtt gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His 960 965 970	2931
ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro 975 980 985	2979
cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu 990 995 1000 1005	3027
gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val 1010 1015 1020	3072
agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val 1025 1030 1035	3117
tgg gct tct tta tac aca agg aga gcc atc cta agc cgt cga gcc Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala 1040 1045 1050	3162
gct ggt gtt tat cag aga gac gcg aca atg gct gtt ctt gtc caa	3207

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala Gly Val Tyr	Gln Arg Asp Ala Thr	Met Ala Val Leu Val Gln	
1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc	3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys	1070 1075 1080
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct	3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro	1085 1090 1095
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cggt ggc acc ccg tgg	3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp	1100 1105 1110
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc	3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala	1115 1120 1125
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct	3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro	1130 1135 1140
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag	3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys	1145 1150 1155
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga	3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg	1160 1165 1170
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca	3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala	1175 1180 1185
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg	3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val	1190 1195 1200
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c		3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro		1205

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val  
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala  
35 40 45

Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys  
 50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys  
 65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser  
 85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val  
 115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp  
 130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe  
 145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu  
 165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly  
 180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp  
 195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser  
 210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser  
 225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly  
 245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg  
 260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser  
 275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr  
 290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly  
 305 310 315 320

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg  
325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val  
340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu  
355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg  
370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln  
385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu  
405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr  
420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe  
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg  
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr  
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp  
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu  
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu  
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr  
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln  
580 585 590



Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn  
 595 600 605  
 Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys  
 610 615 620  
 Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp  
 625 630 635 640  
 Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile  
 645 650 655  
 Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp  
 660 665 670  
 Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val  
 675 680 685  
 Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu  
 690 695 700  
 Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser  
 725 730 735  
 Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp  
 740 745 750  
 Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu  
 755 760 765  
 Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu  
 770 775 780  
 Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val  
 785 790 795 800  
 Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn  
 805 810 815  
 Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr  
 820 825 830  
 Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu  
 835 840 845  
 Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln  
 850 855 860

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser  
 865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr  
 885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly  
 900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly  
 915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr  
 930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val  
 945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro  
 965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val  
 980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met  
 995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met  
 1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser  
 1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val  
 1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu  
 1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp  
 1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly  
 1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser  
 1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn  
 1115 1120 1125

Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly  
1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser  
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala  
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg  
1190 1195 1200

Pro Gln Pro  
1205

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana, Oryza sativa

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg  
1 5 10

<210> 6

<211> 5124

<212> DNA

<213> Citrus reticulata

<220>

<221> CDS

<222> (257)..(4684)

<223>

<300>

<308> EMBL / AY094062

<309> 2003-05-03

[illegible]

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tta agg tgg gaa aga aag ggt aaa cag att tat act cct gaa caa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu 240 245 250	1012
aag gag gag tat gaa gca gct cgc act gag ctg ctg gaa gaa att gtt Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val 255 260 265	1060
aga ggt act tct gtg gag gac ctg cga gca aaa cta aca aac aaa aat Arg Gly Thr Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn 270 275 280	1108
gat aga caa gaa att aag gaa tct tct tcc cat gga aca aaa aat gcg Asp Arg Gln Glu Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala 285 290 295 300	1156
ata ccg gat gat ctt gtg caa ata caa tct tat ata cgg tgg gag aga Ile Pro Asp Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg 305 310 315	1204
gct ggg aag ccc aat tac tct gca gac caa cag ctt aga gaa ttt gag Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu 320 325 330	1252
gaa gca aga aaa gaa ttg caa tct gaa cta gag aag ggt atc tct ctt Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu 335 340 345	1300
gat gaa ata tgg aaa aag att aca aaa ggg gag atc cag act aag gtc Asp Glu Ile Trp Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val 350 355 360	1348
tct gat caa ctt aaa act aaa aag tat ttt aga act gaa agg att cag Ser Asp Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln 365 370 375 380	1396
agg aag cag agg gac ttt atg cag att cta aac aaa cat gtg gct gaa Arg Lys Gln Arg Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu 385 390 395	1444
ccc aca gag aag aag aat att tca gtt gaa cca aaa gcc ttg aca cca Pro Thr Glu Lys Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro 400 405 410	1492
gtt gaa ctt ttc gtc ggg gca act gaa gaa cag gag ggt gat tct att Val Glu Leu Phe Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile 415 420 425	1540
ctt aac aag aag atc tac aag ctt gct ggc aaa gaa ctt ctg gta ctt Leu Asn Lys Lys Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu 430 435 440	1588
gtg cac aag cct ggt ggc aag acc aaa att cac cta gct act gat ggc Val His Lys Pro Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly 445 450 455 460	1636
aaa gag cca ctc att ctc cac tgg gct ttg tct aag aag gct gga gaa Lys Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu 465 470 475	1684
tgg ttg gct ccg cct cca agt gta ctg cct gca ggt tca gtt ttg ctg Trp Leu Ala Pro Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu 480 485 490	1732
agt ggg tca gtt gaa aca aca ttc aca act agc tct ctt gcg gat ctg Ser Gly Ser Val Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu 495 500 505	1780

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct	tat	cag	gtc	caa	tca	att	gaa	ata	gag	att	gaa	gaa	gaa	ggt	tat	1828
Pro	Tyr	Gln	Val	Gln	Ser	Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Tyr	
	510					515					520					
gtt	gga	atg	cca	tct	gtc	ctt	cag	tct	ggc	gga	aac	tgg	ata	aag	aat	1876
Val	Gly	Met	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Gly	Gly	Asn	Trp	Ile	Lys	Asn	
525					530				535						540	
aag	ggc	tct	gac	ttc	tat	gtt	gac	ttt	agc	tat	gaa	tct	aag	caa	gtt	1924
Lys	Gly	Ser	Asp	Phe	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser	Tyr	Glu	Ser	Lys	Gln	Val	
			545						550					555		
caa	cag	gat	ttt	ggc	gat	ggc	aaa	ggt	acg	gcc	aag	gct	ttg	ttg	gag	1972
Gln	Gln	Asp	Phe	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	
			560					565					570			
aaa	ata	gca	gga	ttg	gaa	att	gag	gca	cag	aag	tcc	ttt	atg	cac	cgg	2020
Lys	Ile	Ala	Gly	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Gln	Lys	Ser	Phe	Met	His	Arg	
		575					580					585				
ttt	aac	att	gca	gca	gac	ttg	ata	caa	gaa	gcc	aaa	gag	gct	ggt	gaa	2068
Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	
	590					595					600					
ctg	ggc	ttt	gct	ggg	atc	ttg	gtg	tgg	atg	agg	ttt	atg	gct	aca	agg	2116
Leu	Gly	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Val	Trp	Met	Arg	Phe	Met	Ala	Thr	Arg	
605					610					615					620	
cag	cta	ata	tgg	aat	aaa	aac	tac	aat	gtt	aaa	cca	cgt	gaa	atc	agt	2164
Gln	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Arg	Glu	Ile	Ser	
				625					630					635		
aaa	gcc	cag	gat	agg	ctt	aca	gac	ctg	ctc	cag	aat	gtc	tac	att	agt	2212
Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	
			640					645					650			
aat	cca	gag	tat	agg	gaa	att	gtg	cgc	atg	att	ttg	tct	act	gtt	ggc	2260
Asn	Pro	Glu	Tyr	Arg	Glu	Ile	Val	Arg	Met	Ile	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	
		655					660					665				
cgt	gga	ggt	gaa	gga	gat	gtg	gga	cag	cga	att	cgc	gat	gaa	atc	ctg	2308
Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp	Glu	Ile	Leu	
	670					675					680					
gtt	atc	cag	aga	aac	aat	aat	tgc	aag	ggt	gga	atg	atg	gaa	gaa	tgg	2356
Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asn	Cys	Lys	Gly	Gly	Met	Met	Glu	Glu	Trp	
685					690				695						700	
cat	cag	aag	ttg	cat	aat	aac	act	agt	cct	gat	gat	gtt	ata	att	tgt	2404
His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Ile	Cys	
				705					710					715		
cag	gca	ttg	att	gat	tat	att	aaa	agt	gac	ttc	gac	atc	agt	gcc	tac	2452
Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	
			720					725					730			
tgg	aag	act	ttg	aat	gac	aat	ggc	att	acg	aaa	gaa	cgt	ctt	cta	agt	2500
Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu	Ser	
		735					740					745				
tat	gat	cgt	gcg	atc	cat	tct	gag	cca	aac	ttc	aga	aga	gat	cag	aag	2548
Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	
	750					755					760					
gat	ggt	ctg	ctg	cgt	gac	cta	gga	aac	tac	atg	aga	acc	tta	aag	gcg	2596
Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	Asn	Tyr	Met	Arg	Thr	Leu	Lys	Ala	
765					770					775					780	

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct atc acg aat tgc ttg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly 785 790 795	2644
tac aga tct gag ggt caa ggg ttc atg gtc ggg gtg cag ata aat cct Tyr Arg Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 800 805 810	2692
ata ccg aac ttg cca tct gga ttt cca gaa ttg ctt caa ttt gtc tct Ile Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser 815 820 825	2740
gag cat gtt gaa gat aga aat gta gaa gca ttg ctt gag ggt ttg ctg Glu His Val Glu Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu 830 835 840	2788
gag gct cgt caa gag att cgg cca ttg ctg tgc aag cac aat gat cgt Glu Ala Arg Gln Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg 845 850 855 860	2836
ctg aag gat cta tta ttt ttg gac ata gcc ctt gag tct agt gtt agg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg 865 870 875	2884
aca gct att gaa aaa gga tac gag gaa ttg aac gag gct gga ccg gag Thr Ala Ile Glu Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu 880 885 890	2932
aaa atc atg tac ttt gtc tct ctg att ctt gaa aat ctc gca ctt tca Lys Ile Met Tyr Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 895 900 905	2980
tta gat gac aat gag gat ctc atc tac tgt tta aag ggt tgg agt aat Leu Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn 910 915 920	3028
gct tta agc atg tcc aag agt aaa agt gat aac tgg gca tta ttt gca Ala Leu Ser Met Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala 925 930 935 940	3076
aaa tca gtt ctt gac aga act cgc ctt gca ctc gcc ggc aag gca gac Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp 945 950 955	3124
tgg tac cag aaa gtt ttg caa cct tcg gca gag tat ctt gga acg ctg Trp Tyr Gln Lys Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu 960 965 970	3172
ttg agt gtt gat aag tgg gct gtg gac ata ttt aca gaa gaa atg atc Leu Ser Val Asp Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile 975 980 985	3220
cgt gct gga tca gct gca gct cta tcc tta ctc ctt aat cga ctt gat Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp 990 995 1000	3268
cca gtt ctt cgg aag aca gct agt ctg gga agt tgg cag gtt atc Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 1005 1010 1015	3313
agc cct gtt gaa gtt ttt gga tat gtc gca gtt gtg gat gag tta Ser Pro Val Glu Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu 1020 1025 1030	3358
cta gct gtg cag gat aaa tct tat gat cag cct aca ata tta ctg Leu Ala Val Gln Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu 1035 1040 1045	3403

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gca Ala 1050	aga Arg	cgt Arg	gta Val	aaa Lys	gga Gly 1055	gag Glu	gaa Glu	gaa Glu	att Ile	cca Pro 1060	cat His	ggc Gly	aca Thr	gtt Val	3448
gct Ala 1065	gta Val	ctg Leu	aca Thr	gcg Ala	gat Asp 1070	atg Met	cca Pro	gat Asp	gtc Val	cta Leu 1075	tca Ser	cat His	gtt Val	tca Ser	3493
gtt Val 1080	cga Arg	gct Ala	aga Arg	aat Asn	tgc Cys 1085	aag Lys	gtt Val	tgc Cys	ttc Phe	gct Ala 1090	aca Thr	tgc Cys	ttt Phe	gat Asp	3538
ccc Pro 1095	aat Asn	atc Ile	ttg Leu	gct Ala	gac Asp 1100	cta Leu	caa Gln	tca Ser	aat Asn	gaa Glu 1105	ggg Gly	aaa Lys	atg Met	ctg Leu	3583
cac His 1110	cta Leu	aaa Lys	cca Pro	aca Thr	tct Ser 1115	gct Ala	gat Asp	att Ile	gca Ala	tat Tyr 1120	agt Ser	gtg Val	gtg Val	gag Glu	3628
ggc Gly 1125	agt Ser	gag Glu	cta Leu	caa Gln	gat Asp 1130	tca Ser	agt Ser	tca Ser	gct Ala	aac Asn 1135	ttg Leu	aaa Lys	gaa Glu	gaa Glu	3673
gat Asp 1140	ggg Gly	cct Pro	tca Ser	tct Ser	tct Ser 1145	gtt Val	gca Ala	tta Leu	gtc Val	aaa Lys 1150	aag Lys	cag Gln	ttt Phe	gct Ala	3718
ggc Gly 1155	aga Arg	tat Tyr	gct Ala	ata Ile	aca Thr 1160	tct Ser	gat Asp	gag Glu	ttc Phe	act Thr 1165	ggg Gly	gaa Glu	ctg Leu	gtg Val	3763
ggg Gly 1170	gct Ala	aaa Lys	tca Ser	cgt Arg	aat Asn 1175	att Ile	gca Ala	tat Tyr	ctg Leu	aaa Lys 1180	gga Gly	aaa Lys	gta Val	ccg Pro	3808
tct Ser 1185	tgg Trp	att Ile	ggg Gly	att Ile	ccg Pro 1190	aca Thr	tca Ser	gtt Val	gcc Ala	cta Leu 1195	cca Pro	ttt Phe	gga Gly	gtg Val	3853
ttt Phe 1200	gag Glu	aag Lys	gtt Val	ctt Leu	tca Ser 1205	gat Asp	gac Asp	ata Ile	aat Asn	cag Gln 1210	gca Ala	gtg Val	gca Ala	gag Glu	3898
aag Lys 1215	ttg Leu	caa Gln	att Ile	ttg Leu	aaa Lys 1220	caa Gln	aag Lys	tta Leu	gga Gly	gag Glu 1225	gaa Glu	gac Asp	cat His	agt Ser	3943
gcc Ala 1230	ctt Leu	agg Arg	gag Glu	att Ile	cgg Arg 1235	gaa Glu	aca Thr	gtt Val	tta Leu	cag Gln 1240	atg Met	aaa Lys	gca Ala	cca Pro	3988
aac Asn 1245	cag Gln	ttg Leu	gtc Val	caa Gln	gaa Glu 1250	ctg Leu	aag Lys	aca Thr	gag Glu	atg Met 1255	aaa Lys	agt Ser	tct Ser	ggg Gly	4033
atg Met 1260	cct Pro	tgg Trp	cct Pro	ggg Gly	gat Asp 1265	gaa Glu	ggg Gly	gag Glu	cag Gln	cgc Arg 1270	tgg Trp	gag Glu	caa Gln	gca Ala	4078
tgg Trp 1275	atg Met	gct Ala	atc Ile	aag Lys	aag Lys 1280	gtc Val	tgg Trp	gct Ala	tca Ser	aaa Lys 1285	tgg Trp	aat Asn	gag Glu	aga Arg	4123
gca Ala 1290	ttc Phe	ttc Phe	agc Ser	aca Thr	agg Arg 1295	aga Arg	gta Val	aaa Lys	tta Leu	gat Asp 1300	cat His	gaa Glu	tat Tyr	ctc Leu	4168



## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tgc Cys 1305	atg Met	gct Ala	gtc Val	ctg Leu	gtt Val 1310	cag Gln	gaa Glu	ata Ile	atc Ile	aat Asn 1315	gct Ala	gac Asp	tat Tyr	gca Ala	4213
ttt Phe 1320	gtt Val	atc Ile	cat His	aca Thr	act Thr 1325	aat Asn	ccc Pro	tct Ser	tca Ser	gga Gly 1330	gat Asp	tca Ser	tca Ser	gaa Glu	4258
ata Ile 1335	tat Tyr	gct Ala	gag Glu	gtg Val 1340	gtg Val 1340	aag Lys	gga Gly	ctt Leu	gga Gly	gaa Glu 1345	act Thr	ctc Leu	gtt Val	gga Gly	4303
gct Ala 1350	tat Tyr	cca Pro	ggc Gly	cgt Arg	gct Ala 1355	ttg Leu	agt Ser	ttt Phe	gtc Val	tgc Cys 1360	aag Lys	aaa Lys	aat Asn	gat Asp	4348
ttg Leu 1365	aag Lys	tct Ser	cct Pro	cgg Arg	gtt Val 1370	ttg Leu	ggg Gly	tat Tyr	cca Pro	agc Ser 1375	aag Lys	ccc Pro	att Ile	ggg Gly	4393
ctt Leu 1380	ttt Phe	ata Ile	aga Arg	cga Arg	tca Ser 1385	atc Ile	atc Ile	ttc Phe	cga Arg	tct Ser 1390	gat Asp	tcc Ser	aat Asn	ggg Gly	4438
gaa Glu 1395	gat Asp	ctg Leu	gaa Glu	ggg Gly	tat Tyr 1400	gct Ala	ggg Gly	gct Ala	ggc Gly	ctt Leu 1405	tat Tyr	gat Asp	agt Ser	gtg Val	4483
cca Pro 1410	atg Met	gat Asp	gaa Glu	gcc Ala	gag Glu 1415	aaa Lys	gtt Val	gtg Val	ctt Leu	gat Asp 1420	tac Tyr	tct Ser	tca Ser	gac Asp	4528
cat His 1425	ctg Leu	atc Ile	act Thr	gac Asp	gga Gly 1430	cac His	ttc Phe	cag Gln	caa Gln	tca Ser 1435	att Ile	ctc Leu	tct Ser	tcc Ser	4573
att Ile 1440	gct Ala	cgt Arg	gca Ala	gga Gly	tgt Cys 1445	gag Glu	att Ile	gag Glu	gag Glu	cta Leu 1450	ttt Phe	gga Gly	tct Ser	gca Ala	4618
caa Gln 1455	gac Asp	att Ile	gaa Glu	ggg Gly	gtg Val 1460	gtt Val	agg Arg	gat Asp	ggg Gly	aaa Lys 1465	ata Ile	tat Tyr	gtt Val	gtc Val	4663
cag Gln 1470	aca Thr	aga Arg	ccc Pro	caa Gln	atg Met 1475	tga	ggctgttctt	tttctttttt	attttttcct						4714
gattgggaag ctattgataa aagcattata tcaatgaaaa aaattaaaaa gaaattatag															4774
agggtcaagcc tagaaaggag gaaaggggag tgagtatttta tttggaagca agtgaaataa															4834
agggtacaaaa ggagagagga ataaagttgc aattttcccag aacatgtaaa ttcacttgga															4894
aattgtgtac tggatgcttt gctctgtatg aagactaccg gggtcgaaatg acaacatttt															4954
tgtccatagg catgtaatgt tacatttgat tctgggtaat accatacgct tcattatagg															5014
ggatcagcag atactatgtt gtagttgaaa tgtaatgtta taataaaatg ttaatacaaa															5074
tgttataaca tttgtattaa cctgtaacgt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa															5124

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1475

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Citrus reticulata

&lt;400&gt; 7

Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln Ser Leu Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser Ser Gly Ile Pro  
 20 25 30  
 Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln Pro Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Ser  
 50 55 60  
 Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His Arg Pro Val Leu  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Ala  
 85 90 95  
 Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln Ile Thr Val Gly  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile Glu Ile Ser Tyr  
 115 120 125  
 Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile Arg Asp Lys Lys  
 130 135 140  
 Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly Thr Lys Ile Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser Gly Ser Lys Ser  
 165 170 175  
 Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu Ala Val Glu Phe  
 180 185 190  
 Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Ala  
 195 200 205  
 Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu Ile Gln Asn Val  
 210 215 220  
 Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu  
 225 230 235 240

Arg Lys Gly Lys Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr  
 245 250 255

Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val Arg Gly Thr Ser  
 260 265 270

Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn Asp Arg Gln Glu  
 275 280 285

Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala Ile Pro Asp Asp  
 290 295 300

Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg Ala Gly Lys Pro  
 305 310 315 320

Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys  
 325 330 335

Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu Asp Glu Ile Trp  
 340 345 350

Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ser Asp Gln Leu  
 355 360 365

Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln Arg Lys Gln Arg  
 370 375 380

Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu Pro Thr Glu Lys  
 385 390 395 400

Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro Val Glu Leu Phe  
 405 410 415

Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile Leu Asn Lys Lys  
 420 425 430

Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu Val His Lys Pro  
 435 440 445

Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly Lys Glu Pro Leu  
 450 455 460

Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu Trp Leu Ala Pro  
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu Ser Gly Ser Val  
 485 490 495

Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu Pro Tyr Gln Val  
 500 505 510

Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val Gln Gln Asp Phe  
545 550 555 560

Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala  
580 585 590

Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp  
610 615 620

Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser Asn Pro Glu Tyr  
645 650 655

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg  
675 685

His 705 Asn Asn Thr Ser Pro 710 Asp Asp Val Ile Ile 715 Cys Gln Ala Leu Ile 720

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr Trp Lys Thr Leu  
725 730 735

Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala  
740 745 750

Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Asp Gly Leu Leu  
755 760 765

Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly  
770 775 780

Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly Tyr Arg Ser Glu  
 785 790 795 800

Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Ile Pro Asn Leu  
 805 810 815

Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser Glu His Val Glu  
 820 825 830

Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln  
 835 840 845

Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg Leu Lys Asp Leu  
 850 855 860

Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Ile Glu  
 865 870 875 880

Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr  
 885 890 895

Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Leu Asp Asp Asn  
 900 905 910

Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn Ala Leu Ser Met  
 915 920 925

Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ser Val Leu  
 930 935 940

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp Trp Tyr Gln Lys  
 945 950 955 960

Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu Leu Ser Val Asp  
 965 970 975

Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile Arg Ala Gly Ser  
 980 985 990

Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg  
 995 1000 1005

Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu  
 1010 1015 1020

Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln  
 1025 1030 1035

Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu Ala Arg Arg Val  
 1040 1045 1050

Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro His Gly Thr Val Ala Val Leu Thr  
 1055 1060 1065  
 Ala Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg  
 1070 1075 1080  
 Asn Cys Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu  
 1085 1090 1095  
 Ala Asp Leu Gln Ser Asn Glu Gly Lys Met Leu His Leu Lys Pro  
 1100 1105 1110  
 Thr Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Val Val Glu Gly Ser Glu Leu  
 1115 1120 1125  
 Gln Asp Ser Ser Ser Ala Asn Leu Lys Glu Glu Asp Gly Pro Ser  
 1130 1135 1140  
 Ser Ser Val Ala Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala  
 1145 1150 1155  
 Ile Thr Ser Asp Glu Phe Thr Gly Glu Leu Val Gly Ala Lys Ser  
 1160 1165 1170  
 Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Ile Gly  
 1175 1180 1185  
 Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val  
 1190 1195 1200  
 Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Ala Val Ala Glu Lys Leu Gln Ile  
 1205 1210 1215  
 Leu Lys Gln Lys Leu Gly Glu Glu Asp His Ser Ala Leu Arg Glu  
 1220 1225 1230  
 Ile Arg Glu Thr Val Leu Gln Met Lys Ala Pro Asn Gln Leu Val  
 1235 1240 1245  
 Gln Glu Leu Lys Thr Glu Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro  
 1250 1255 1260  
 Gly Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile  
 1265 1270 1275  
 Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Phe Phe Ser  
 1280 1285 1290  
 Thr Arg Arg Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Cys Met Ala Val  
 1295 1300 1305

Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His  
 1310 1315 1320

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu  
 1325 1330 1335

Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly  
 1340 1345 1350

Arg Ala Leu Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Lys Ser Pro  
 1355 1360 1365

Arg Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg  
 1370 1375 1380

Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu  
 1385 1390 1395

Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu  
 1400 1405 1410

Ala Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp His Leu Ile Thr  
 1415 1420 1425

Asp Gly His Phe Gln Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala  
 1430 1435 1440

Gly Cys Glu Ile Glu Glu Leu Phe Gly Ser Ala Gln Asp Ile Glu  
 1445 1450 1455

Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro  
 1460 1465 1470

Gln Met  
 1475

<210> 8

<211> 4200

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4200)

<223>

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; EMBL / AF312027

&lt;309&gt; 2001-01-08

&lt;400&gt; 8

atg agt aac tct gta gtg cat aac tta ctt aac cgg ggt ttg att cgt	48
Met Ser Asn Ser Val Val His Asn Leu Leu Asn Arg Gly Leu Ile Arg	
1 5 10 15	
cct ctt aac ttt gaa cat caa aac aag ctc aac tcc tct gtg tac caa	96
Pro Leu Asn Phe Glu His Gln Asn Lys Leu Asn Ser Ser Val Tyr Gln	
20 25 30	
act tca aca gca aat ccg gct ctt ggc aag att ggc aga tca aaa ctt	144
Thr Ser Thr Ala Asn Pro Ala Leu Gly Lys Ile Gly Arg Ser Lys Leu	
35 40 45	
tac ggg aaa ggt ctt aag cag gca gga cgc agt ctg gtc act gaa aca	192
Tyr Gly Lys Gly Leu Lys Gln Ala Gly Arg Ser Leu Val Thr Glu Thr	
50 55 60	
gga gga aga cct ctc tca ttt gtt cca cga gct gtc ctt gcc atg gat	240
Gly Gly Arg Pro Leu Ser Phe Val Pro Arg Ala Val Leu Ala Met Asp	
65 70 75 80	
cct cag gca gcc gag aaa ttt agt ctt gac gga aat atc gat tta ctg	288
Pro Gln Ala Ala Glu Lys Phe Ser Leu Asp Gly Asn Ile Asp Leu Leu	
85 90 95	
gtt gaa gtc act tct aca act gta aga gaa gta aat atc cag ata gct	336
Val Glu Val Thr Ser Thr Val Arg Glu Val Asn Ile Gln Ile Ala	
100 105 110	
tat aca agt gac aca ttg ttc cta cac tgg ggt gca att ctt gac aac	384
Tyr Thr Ser Asp Thr Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Ile Leu Asp Asn	
115 120 125	
aaa gaa aat tgg gtt cta cct tct cgc tct ccg gat aga act caa aac	432
Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn	
130 135 140	
ttc aag aac agt gcg ctt aga act cca ttt gtg aaa tcc ggt ggc aat	480
Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn	
145 150 155 160	
tct cac ctt aaa cta gag ata gat gat cct gcc ata cac gct att gag	528
Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu	
165 170 175	
ttc ctt ata ttt gac gaa agt cgg aac aaa tgg tat aaa aat aat ggt	576
Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly	
180 185 190	
cag aat ttt cat ata aac tta cca acg gaa agg aat gtg aaa caa aat	624
Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn	
195 200 205	
gtt tct gtt cct gaa gat ctt gta cag atc caa gca tat ctt aga tgg	672
Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp	
210 215 220	
gaa cgt aag ggt aaa caa atg tac aac cct gag aaa gag aag gag gag	720
Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Asn Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu	
225 230 235 240	



## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tat Tyr	gaa Glu	gcc Ala	gcc Ala	cgg Arg 245	acg Thr	gag Glu	cta Leu	cgg Arg 250	gag Glu 250	gaa Glu	atg Met	atg Met	cga Arg	ggt Gly 255	gct Ala	768
tca Ser	gtg Val	gaa Glu	gat Asp 260	ctc Leu	aga Arg	gca Ala	aag Lys	ctg Leu 265	ttg Leu	aag Lys	aaa Lys	gat Asp	aac Asn 270	agt Ser	aat Asn	816
gaa Glu	tcc Ser	cca Pro 275	aaa Lys	tct Ser	aat Asn	ggg Gly	aca Thr 280	tca Ser	tcc Ser	agt Ser	gga Gly	cgg Arg 285	gag Glu	gaa Glu	aag Lys	864
aaa Lys	aaa Lys 290	ggt Val	tcc Ser	aag Lys	caa Gln	cca Pro 295	gag Glu	cgt Arg	aaa Lys	aaa Lys	aat Asn 300	tat Tyr	aac Asn	act Thr	gac Asp	912
aag Lys 305	atc Ile	cag Gln	cgc Arg	aag Lys	gga Gly 310	agg Arg	gac Asp	ctg Leu	act Thr	aag Lys 315	ctt Leu	atc Ile	tat Tyr	aag Lys	cat His 320	960
ggt Val	gct Ala	gat Asp	ttt Phe	gtt Val 325	gaa Glu	cca Pro	gaa Glu	tcc Ser	aaa Lys 330	tcc Ser	tca Ser	tct Ser	gaa Glu	cca Pro 335	cgg Arg	1008
tcc Ser	tta Leu	aca Thr	act Thr 340	ctg Leu	gag Glu	ata Ile	tac Tyr	gcc Ala 345	aaa Lys	gca Ala	aag Lys	gag Glu	gaa Glu	caa Gln	gaa Glu	1056
acc Thr	act Thr	cca Pro 355	gtc Val	ttt Phe	agc Ser	aag Lys	aaa Lys 360	aca Thr	ttc Phe	aag Lys	ctt Leu	gaa Glu 365	ggc Gly	agt Ser	gcg Ala	1104
att Ile	ttg Leu 370	gtg Val	ttt Phe	gtt Val	act Thr	aaa Lys 375	ctt Leu	tcc Ser	gga Gly	aag Lys	acg Thr 380	aaa Lys	att Ile	cat His	gtg Val	1152
gca Ala 385	act Thr	gat Asp	ttt Phe	aaa Lys	gag Glu 390	ccg Pro	gtt Val	acc Thr	ctt Leu	cac His 395	tgg Trp	gct Ala	ttg Leu	tct Ser	caa Gln 400	1200
aag Lys	ggt Gly	gga Gly	gaa Glu	tgg Trp 405	ttg Leu	gac Asp	cca Pro	cct Pro	tca Ser 410	gat Asp	ata Ile	ctg Leu	cca Pro	cca Pro 415	aac Asn	1248
tct Ser	ttg Leu	cca Pro	gta Val 420	cgt Arg	ggg Gly	gct Ala	gtt Val	gat Asp 425	aca Thr	aaa Lys	ctg Leu	acc Thr	atc Ile 430	act Thr	tca Ser	1296
aca Thr	gat Asp	ctt Leu 435	cct Pro	agt Ser	ccg Pro	gtt Val	caa Gln 440	act Thr	ttt Phe	gag Glu	ctg Leu	gaa Glu 445	ata Ile	gaa Glu	ggt Gly	1344
gac Asp	agc Ser	tac Tyr	aag Lys	ggc Gly	atg Met	ccg Pro 455	ttt Phe	gta Val	ctc Leu	aat Asn	gct Ala 460	ggt Gly	gaa Glu	agg Arg	tgg Trp	1392
att Ile 465	aaa Lys	aat Asn	aat Asn	gac Asp	agt Ser 470	gac Asp	ttt Phe	tat Tyr	gtg Val	gac Asp 475	ttt Phe	gct Ala	aaa Lys	gaa Glu	gaa Glu 480	1440
aaa Lys	cat His	gtt Val	cag Gln	aag Lys 485	gat Asp	tat Tyr	ggc Gly	gat Asp	gga Gly 490	aag Lys	ggt Gly	aca Thr	gcc Ala	aag Lys 495	cat His	1488
tta Leu	ctg Leu	gac Asp	aaa Lys 500	atc Ile	gca Ala	gat Asp	ttg Leu 505	gag Glu 505	agt Ser	gag Glu	gcc Ala	cag Gln	aag Lys 510	tct Ser	ttc Phe	1536

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; RI\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

atg	cat	cga	ttc	aac	att	gca	gca	gat	ctt	gtg	gac	gag	gca	aaa	agt	1584
Met	His	Arg	Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	
		515					520					525				
gct	ggc	caa	ctg	ggc	ttt	gca	ggg	atc	cta	gtc	tgg	atg	agg	ttt	atg	1632
Ala	Gly	Gln	Leu	Gly	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Val	Trp	Met	Arg	Phe	Met	
	530					535					540					
gct	aca	aga	cag	ctt	gtg	tgg	aac	aaa	aac	tat	aat	gtt	aag	cca	agg	1680
Ala	Thr	Arg	Gln	Leu	Val	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Arg	
545					550					555					560	
gag	ata	agc	aaa	gcg	cag	gat	aga	ctg	act	gac	ctt	ctc	cag	gac	gtt	1728
Glu	Ile	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	
				565					570					575		
tat	gca	agt	tat	cca	gag	tac	aga	gaa	ctt	ttg	cgg	atg	ata	atg	tct	1776
Tyr	Ala	Ser	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Leu	Arg	Met	Ile	Met	Ser	
			580					585					590			
act	gta	ggc	cga	gga	ggc	gaa	gga	gat	gtc	ggg	caa	cga	atc	cgt	gac	1824
Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp	
		595					600					605				
gaa	att	cta	gtc	atc	cag	cgg	aaa	aat	gac	tgc	aag	ggc	gga	att	atg	1872
Glu	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Ile	Met	
	610					615					620					
gag	gaa	tgg	cat	cag	aag	ttg	cat	aac	aac	act	agt	cca	gat	gat	gtt	1920
Glu	Glu	Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	
625					630					635					640	
gtc	atc	tgt	cag	gca	ttg	atg	gat	tat	atc	aaa	agt	gac	ttt	gac	tta	1968
Val	Ile	Cys	Gln	Ala	Leu	Met	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Leu	
				645					650					655		
agt	gtt	tac	tgg	aag	acc	ttg	aac	gat	aat	ggc	ata	acc	aaa	gag	cga	2016
Ser	Val	Tyr	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg	
			660					665					670			
ctc	tta	agt	tat	gat	cgt	gct	ata	cat	tct	gaa	cca	aat	ttt	aga	gga	2064
Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Gly	
		675					680					685				
gaa	caa	aaa	gac	ggc	ctt	ttg	cgt	gat	ctt	gga	cac	tac	atg	agg	act	2112
Glu	Gln	Lys	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Arg	Thr	
	690					695				700						
tta	aag	gct	gtt	cat	tca	ggg	gca	gac	ctt	gag	tcg	gct	ata	caa	aat	2160
Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Gln	Asn	
705					710					715					720	
tgc	atg	ggc	tac	caa	gat	gac	ggc	gaa	ggc	ttc	atg	gtt	ggg	gtg	cag	2208
Cys	Met	Gly	Tyr	Gln	Asp	Asp	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	Gln	
				725					730					735		
ata	aat	cct	gta	tca	gga	ttg	cct	tct	gga	tat	cca	gac	ttg	ctt	cgt	2256
Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Tyr	Pro	Asp	Leu	Leu	Arg	
			740					745					750			
ttc	gtc	cta	gaa	cat	gtt	gaa	gaa	aag	aat	gta	gag	cca	ctt	ctt	gag	2304
Phe	Val	Leu	Glu	His	Val	Glu	Glu	Lys	Asn	Val	Glu	Pro	Leu	Leu	Glu	
		755					760					765				
ggc	ttg	ctt	gaa	gct	cgt	caa	gag	cta	agg	cca	ctt	ctg	ctg	aag	tcc	2352
Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	
	770					775						780				

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cat His 785	gac Asp	cg Arg	ctc Leu	aag Lys	gat Asp 790	ctg Leu	tta Leu	ttc Phe	ttg Leu	gac Asp 795	ctc Leu	gct Ala	ctt Leu	gat Asp	tct Ser 800	2400
act Thr	gtc Val	aga Arg	aca Thr	gcg Ala 805	att Ile	gaa Glu	aga Arg	gga Gly	tat Tyr 810	gag Glu	caa Gln	ttg Leu	aat Asn	gat Asp 815	gct Ala	2448
gga Gly	cct Pro	gag Glu	aaa Lys 820	atc Ile	atg Met	tac Tyr	ttc Phe	atc Ile 825	agc Ser	cta Leu	gtt Val	ctt Leu	gaa Glu 830	aat Asn	ctt Leu	2496
gcc Ala	ctc Leu	tct Ser 835	tca Ser	gat Asp	gac Asp	aat Asn	gaa Glu 840	gac Asp	ctt Leu	ata Ile	tac Tyr	tgc Cys 845	ttg Leu	aag Lys	gga Gly	2544
tgg Trp 850	caa Gln	ttt Phe	gcc Ala	ctc Leu	gac Asp	atg Met 855	tgc Cys	aag Lys	agc Ser	aaa Lys	aaa Lys 860	gat Asp	cac His	tgg Trp	gct Ala	2592
ctg Leu 865	tat Tyr	gca Ala	aaa Lys	tct Ser	gtt Val 870	ctt Leu	gac Asp	aga Arg	agc Ser	cga Arg 875	cta Leu	gca Ala	ctg Leu	gca Ala	agc Ser 880	2640
aaa Lys	gct Ala	gag Glu	agg Arg	tac Tyr 885	ctt Leu	gaa Glu	att Ile	ctg Leu	caa Gln 890	cca Pro	tgc Ser	gct Ala	gaa Glu	tat Tyr 895	ctt Leu	2688
gga Gly	tct Ser	tgt Cys	ctt Leu 900	gga Gly	gtc Val	gat Asp	cag Gln	tgc Ser 905	gct Ala	gtt Val	agt Ser	ata Ile	ttt Phe 910	act Thr	gaa Glu	2736
gag Glu	atc Ile	att Ile 915	cga Arg	gct Ala	gga Gly	tct Ser	gca Ala 920	gca Ala	gca Ala	ttg Leu	tgc Ser	tca Ser 925	ctt Leu	gtt Val	aac Asn	2784
cga Arg 930	ctt Leu	gac Asp	cca Pro	gtt Val	ctt Leu	agg Arg 935	aag Lys	act Thr	gct Ala	aac Asn	ttg Leu 940	gga Gly	agt Ser	tgg Trp	cag Gln	2832
gtt Val 945	att Ile	agt Ser	cct Pro	gta Val	gag Glu 950	gtc Val	gtc Val	gga Gly	tat Tyr	gtc Val 955	att Ile	gtt Val	gtg Val	gac Asp	gaa Glu 960	2880
ttg Leu	ctc Leu	act Thr	gta Val	cag Gln 965	aat Asn	aaa Lys	acc Thr	tac Tyr	gat Asp 970	aga Arg	cct Pro	aca Thr	att Ile	ata Ile 975	gtt Val	2928
gca Ala	aac Asn	aga Arg	gtg Val 980	aga Arg	gga Gly	gag Glu	gag Glu	gaa Glu 985	atc Ile	cct Pro	gat Asp	ggt Gly	gca Ala 990	gtt Val	gcg Ala	2976
gta Val	ctg Leu	aca Thr 995	cct Pro	gac Asp	atg Met	ccg Pro	gat Asp 1000	gta Val	cta Leu	tct Ser	cat His	gtt Val 1005	tct Ser	gtt Val	cga Arg	3024
gca Ala	aga Arg 1010	aat Asn	gga Gly	aag Lys	atc Ile	tgc Cys 1015	ttt Phe	gcc Ala	aca Thr	tgt Cys	ttt Phe 1020	gat Asp	tct Ser	ggt Gly		3069
atc Ile 1025	tta Leu	tct Ser	gac Asp	ctc Leu	caa Gln	gga Gly 1030	aaa Lys	gat Asp	gga Gly	aaa Lys	ctg Leu 1035	ttg Leu	agc Ser	cta Leu		3114
caa Gln 1040	cca Pro	acc Thr	tct Ser	gca Ala	gat Asp	gta Val 1045	gtc Val	tat Tyr	aaa Lys	gag Glu	gta Val 1050	aac Asn	gat Asp	agt Ser		3159

gag Glu	ctt Leu	tcg Ser	agt Ser	cca Pro	agt Ser	tca Ser	gac Asp	aac Asn	ctg Leu	gaa Glu	gat Asp	gcc Ala	cct Pro	cca Pro	3204
1055						1060					1065				
agt Ser	att Ile	tct Ser	ttg Leu	gtc Val	aag Lys	aaa Lys	cag Gln	ttt Phe	gcg Ala	ggg Gly	aga Arg	tat Tyr	gct Ala	ata Ile	3249
1070						1075					1080				
tca Ser	tct Ser	gag Glu	gag Glu	ttc Phe	aca Thr	agt Ser	gac Asp	ttg Leu	ggt Val	ggg Gly	gct Ala	aaa Lys	tca Ser	aga Arg	3294
1085						1090					1095				
aat Asn	atc Ile	ggg Gly	tat Tyr	ctg Leu	aaa Lys	gga Gly	aaa Lys	ggt Val	cct Pro	tct Ser	tgg Trp	ggt Val	ggt Gly	atc Ile	3339
1100						1105					1110				
cca Pro	act Thr	tca Ser	ggt Val	gag Ala	ttg Leu	cca Pro	ttt Phe	ggg Gly	ggt Val	ttt Phe	gag Glu	aag Lys	ggt Val	atc Ile	3384
1115						1120					1125				
tcc Ser	gaa Glu	aag Lys	gag Ala	aat Asn	cag Gln	gag Ala	gtg Val	aac Asn	gat Asp	aaa Lys	ttg Leu	cta Leu	gta Val	ttg Leu	3429
1130						1135					1140				
aag Lys	aaa Lys	act Thr	ctt Leu	gat Asp	gag Glu	gga Gly	gac Asp	caa Gln	ggg Gly	gct Ala	ctg Leu	aag Lys	gaa Glu	atc Ile	3474
1145						1150					1155				
cgg Arg	cag Gln	aca Thr	ctg Leu	ttg Leu	ggg Gly	cta Leu	ggt Val	gca Ala	ccc Pro	cca Pro	gaa Glu	ctg Leu	ggt Val	gaa Glu	3519
1160						1165					1170				
gaa Glu	ctg Leu	aaa Lys	agt Ser	act Thr	atg Met	aaa Lys	agt Ser	tct Ser	gac Asp	atg Met	cca Pro	tgg Trp	ccg Pro	ggg Gly	3564
1175						1180					1185				
gat Asp	gaa Glu	ggg Gly	gaa Glu	cag Gln	aga Arg	tgg Trp	gag Glu	caa Gln	gct Ala	tgg Trp	gca Ala	gcc Ala	att Ile	aaa Lys	3609
1190						1195					1200				
aag Lys	gtc Val	tgg Trp	gct Ala	tcg Ser	aaa Lys	tgg Trp	aac Asn	gag Glu	aga Arg	gca Ala	tac Tyr	ttc Phe	agc Ser	acg Thr	3654
1205						1210					1215				
agg Arg	aaa Lys	gta Val	aaa Lys	ctg Leu	gat Asp	cat His	gac Asp	tat Tyr	ctc Leu	tgc Cys	atg Met	gct Ala	ggt Val	ttg Leu	3699
1220						1225					1230				
gtc Val	caa Gln	gaa Glu	gtc Val	atc Ile	aat Asn	gag Ala	gat Asp	tac Tyr	gca Ala	ttc Phe	gtc Val	att Ile	cac His	aca Thr	3744
1235						1240					1245				
act Thr	aat Asn	cca Pro	tct Ser	tct Ser	gga Gly	gat Asp	tca Ser	tca Ser	gag Glu	att Ile	tat Tyr	gcc Ala	gag Glu	gtg Val	3789
1250						1255					1260				
gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	ctt Leu	ggg Gly	gaa Glu	act Thr	ctt Leu	gta Val	gga Gly	gca Ala	tat Tyr	ccc Pro	ggg Gly	cgg Arg	3834
1265						1270					1275				
tct Ser	ctg Leu	agt Ser	ttc Phe	atc Ile	tgc Cys	aag Lys	aaa Lys	aac Asn	aac Asn	ctt Leu	gat Asp	tcg Ser	cct Pro	ctg Leu	3879
1280						1285					1290				
gtg Val	ttg Leu	ggc Gly	tac Tyr	cca Pro	agc Ser	aaa Lys	ccg Pro	att Ile	ggg Gly	ctg Leu	ttc Phe	ata Ile	aga Arg	cgt Arg	3924
1295						1300					1305				

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tca atc atc ttc aga tct gat tcc aat gga gaa gat ctt gaa ggt	3969
Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly	
1310 1315 1320	
tat gca ggt gca ggc ctc tac gac agt gta cca atg gac gag gaa	4014
Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu	
1325 1330 1335	
gac caa gtc gtg ctc gat tac aca aca gat cct ctg atc act gac	4059
Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp	
1340 1345 1350	
ttg agc ttc cag aaa aag gtt ctc tca gac att gca cgc gct gga	4104
Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly	
1355 1360 1365	
gat gcc att gag aaa ctc tat gga act gca cag gac att gaa ggt	4149
Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly	
1370 1375 1380	
gtg atc aga gac ggg aag ctc tat gtc gtc cag aca cga cca caa	4194
Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln	
1385 1390 1395	
gtg tga	4200
Val	

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1399

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 9

Met Ser Asn Ser Val Val His Asn Leu Leu Asn Arg Gly Leu Ile Arg	
1 5 10 15	
Pro Leu Asn Phe Glu His Gln Asn Lys Leu Asn Ser Ser Val Tyr Gln	
20 25 30	
Thr Ser Thr Ala Asn Pro Ala Leu Gly Lys Ile Gly Arg Ser Lys Leu	
35 40 45	
Tyr Gly Lys Gly Leu Lys Gln Ala Gly Arg Ser Leu Val Thr Glu Thr	
50 55 60	
Gly Gly Arg Pro Leu Ser Phe Val Pro Arg Ala Val Leu Ala Met Asp	
65 70 75 80	
Pro Gln Ala Ala Glu Lys Phe Ser Leu Asp Gly Asn Ile Asp Leu Leu	
85 90 95	
Val Glu Val Thr Ser Thr Thr Val Arg Glu Val Asn Ile Gln Ile Ala	
100 105 110	

Tyr Thr Ser Asp Thr Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Ile Leu Asp Asn  
 115 120 125  
 Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn  
 130 135 140  
 Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu  
 165 170 175  
 Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly  
 180 185 190  
 Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn  
 195 200 205  
 Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp  
 210 215 220  
 Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Asn Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Arg Glu Glu Met Met Arg Gly Ala  
 245 250 255  
 Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Leu Lys Lys Asp Asn Ser Asn  
 260 265 270  
 Glu Ser Pro Lys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Gly Arg Glu Glu Lys  
 275 280 285  
 Lys Lys Val Ser Lys Gln Pro Glu Arg Lys Lys Asn Tyr Asn Thr Asp  
 290 295 300  
 Lys Ile Gln Arg Lys Gly Arg Asp Leu Thr Lys Leu Ile Tyr Lys His  
 305 310 315 320  
 Val Ala Asp Phe Val Glu Pro Glu Ser Lys Ser Ser Ser Glu Pro Arg  
 325 330 335  
 Ser Leu Thr Thr Leu Glu Ile Tyr Ala Lys Ala Lys Glu Glu Gln Glu  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Val Phe Ser Lys Lys Thr Phe Lys Leu Glu Gly Ser Ala  
 355 360 365  
 Ile Leu Val Phe Val Thr Lys Leu Ser Gly Lys Thr Lys Ile His Val  
 370 375 380

Ala Thr Asp Phe Lys Glu Pro Val Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Gln  
385 390 395 400

Lys Gly Gly Glu Trp Leu Asp Pro Pro Ser Asp Ile Leu Pro Pro Asn  
405 410 415

Ser Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Asp Thr Lys Leu Thr Ile Thr Ser  
420 425 430

Thr Asp Leu Pro Ser Pro Val Gln Thr Phe Glu Leu Glu Ile Glu Gly  
435 440 445

Asp Ser Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Asn Ala Gly Glu Arg Trp  
450 455 460

Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu  
465 470 475 480

Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His  
485 490 495

Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe  
500 505 510

Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser  
515 520 525

Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met  
530 535 540

Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg  
545 550 555 560

Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val  
565 570 575

Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser  
580 585 590

Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp  
595 600 605

Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met  
610 615 620

Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val  
625 630 635 640

Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu  
645 650 655

Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg  
660 665 670

Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly  
675 680 685

Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr  
690 695 700

Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn  
705 710 715 720

Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln  
725 730 735

Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg  
740 745 750

Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu  
755 760 765

Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Ser  
770 775 780

His Asp Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Asp Ser  
785 790 795 800

Thr Val Arg Thr Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ala  
805 810 815

Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu  
820 825 830

Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly  
835 840 845

Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala  
850 855 860

Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser  
865 870 875 880

Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu  
885 890 895

Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu  
900 905 910

Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn  
915 920 925



Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln  
 930 935 940  
 Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu  
 945 950 955 960  
 Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val  
 965 970 975  
 Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala  
 980 985 990  
 Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg  
 995 1000 1005  
 Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly  
 1010 1015 1020  
 Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu  
 1025 1030 1035  
 Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser  
 1040 1045 1050  
 Glu Leu Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asn Leu Glu Asp Ala Pro Pro  
 1055 1060 1065  
 Ser Ile Ser Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Ile  
 1070 1075 1080  
 Ser Ser Glu Glu Phe Thr Ser Asp Leu Val Gly Ala Lys Ser Arg  
 1085 1090 1095  
 Asn Ile Gly Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Ile  
 1100 1105 1110  
 Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Ile  
 1115 1120 1125  
 Ser Glu Lys Ala Asn Gln Ala Val Asn Asp Lys Leu Leu Val Leu  
 1130 1135 1140  
 Lys Lys Thr Leu Asp Glu Gly Asp Gln Gly Ala Leu Lys Glu Ile  
 1145 1150 1155  
 Arg Gln Thr Leu Leu Gly Leu Val Ala Pro Pro Glu Leu Val Glu  
 1160 1165 1170  
 Glu Leu Lys Ser Thr Met Lys Ser Ser Asp Met Pro Trp Pro Gly  
 1175 1180 1185

Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ala Ala Ile Lys  
 1190 1195 1200  
 Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr  
 1205 1210 1215  
 Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu  
 1220 1225 1230  
 Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr  
 1235 1240 1245  
 Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val  
 1250 1255 1260  
 Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg  
 1265 1270 1275  
 Ser Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Asn Asn Leu Asp Ser Pro Leu  
 1280 1285 1290  
 Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Arg  
 1295 1300 1305  
 Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly  
 1310 1315 1320  
 Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu  
 1325 1330 1335  
 Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp  
 1340 1345 1350  
 Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly  
 1355 1360 1365  
 Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly  
 1370 1375 1380  
 Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln  
 1385 1390 1395

val

<210> 10

<211> 4851

<212> DNA

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (105)..(4499)

<223>

<300>

<308> EMBL / Y09533

<309> 1998-07-30

<400> 10

```

catcttcacg gaatttctcg aagcttcttc gctaatttcc tggtttcttc actcaaaatc      60
gacgtttcta gctgaacttg agtgaattaa gccagtggga ggat atg agt aat tcc      116
                                         Met Ser Asn Ser
                                         1

tta ggg aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg      164
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu
5                               10                               15                               20

gaa cat aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg      212
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu
                               25                               30                               35

ttt caa caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga      260
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg
                               40                               45                               50

ggg aac agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gaa aag aag      308
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys
55                               60                               65

cgt gct ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct      356
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser
70                               75                               80

tct gag cta gca gaa aag ttc agt cta ggg ggg aat att gag cta cag      404
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln
85                               90                               95                               100

gtt gat gtt agg cct ccc act tca ggt gat gtg tcc ttt gtg gat ttt      452
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe
105                               110                               115

caa gta aca aat ggt agt gat aaa ctg ttt ttg cac tgg ggg gca gta      500
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val
120                               125                               130

aaa ttc ggg aaa gaa aca tgg tct ctt ccg aat gat cgt cca gat ggg      548
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly
135                               140                               145

acc aaa gtg tac aag aac aaa gca ctt aga act cca ttt gtt aaa tct      596
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser
150                               155                               160

```

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ggc tct aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cga gac act gct atc gaa Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu 165 170 175 180	644
gct att gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc cac gat aaa tgg ata aag Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys 185 190 195	692
aat aat ggt ggt aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg 200 205 210	740
ggc cca gat gtt tct gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr 215 220 225	788
ttg agg tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac ccc cct gag aaa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu 230 235 240	836
aag gag gaa tat gag gct gct cga act gtg cta cag gag gaa ata gct Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala 245 250 255 260	884
cgt ggt gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn 265 270 275	932
gat aaa agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gat Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980
ata cct gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028
gca gga aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076
gaa gca aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124
gat gag ttg cgg aaa acg att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gtg Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172
gaa aag cac ctg aaa aga agt tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220
aag aag aga gac ttt ggg cat ctt att aat aag tat act tcc agt cct Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268
gca gta caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316
att aag ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364
cta aat aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu 425 430 435	1412

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gta gca aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat cta gct aca gat ctg Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu	1460
aat cag cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cct gga gag Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu	1508
tgg atg gta cca cct tca agc ata ttg cct cct ggg tca att att tta Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu	1556
gac aag gct gcc gaa aca cct ttt tca gcc agt tct tct gat ggt cta Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu	1604
act tct aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe	1652
gtg ggg atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn	1700
caa ggg tcg gat ttc tat gtt ggc ttc agt gct gca tcc aaa tta gca Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala	1748
ctc aag gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp	1796
aaa ata gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg	1844
ttt aat att gca gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu	1892
ctt ggt ttt gct gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg	1940
caa ctg ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser	1988
aag gct cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser	2036
cac cct cag tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly	2084
cgt gga ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu	2132
gtc atc cag agg aac aat gac tgc aag ggt ggt atg atg caa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp	2180
cat cag aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys	2228

cag gca tta att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720	2276
tgg aaa acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740	2324
tat gac cgt gct atc cat tct gaa cca aat ttt aga gga gat caa aag Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755	2372
ggg ggt ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gca Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770	2420
gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785	2468
tac aaa act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800	2516
gta tca ggc ttg cca tct ggc ttt cag gac ctc ctc cat ttt gtc tta Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820	2564
gac cat gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag aga ttg cta Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu 825 830 835	2612
gag gct cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg 840 845 850	2660
cta aag gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg 855 860 865	2708
aca gca gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu 870 875 880	2756
aaa atc atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 885 890 895 900	2804
gtg gac gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga tgg aat caa Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln 905 910 915	2852
gct ctt tca atg tcc aat ggt ggg gac aac cat tgg gct tta ttt gca Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala 920 925 930	2900
aaa gct gtg ctt gac aga acc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu 935 940 945	2948
tgg tac cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca ata Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile 950 955 960	2996
ctt ggg gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile 965 970 975 980	3044

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cg	gt	gga	tca	gca	gct	tca	tta	tcc	tct	ctt	ctt	aat	aga	ctc	gat	3092
Arg	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Asn	Arg	Leu	Asp	
			985						990					995		
ccc	gtg	ctt	cgg	aaa	act	gca	aat	cta	gga	agt	tgg	cag	att	atc		3137
Pro	Val	Leu	Arg	Lys	Thr	Ala	Asn	Leu	Gly	Ser	Trp	Gln	Ile	Ile		
			1000					1005					1010			
agt	cca	gtt	gaa	gcc	gtt	gga	tat	gtt	gtc	gtt	gtg	gat	gag	ttg		3182
Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Val	Val	Val	Asp	Glu	Leu		
			1015					1020					1025			
ctt	tca	gtt	cag	aat	gaa	atc	tac	gag	aag	ccc	acg	atc	tta	gta		3227
Leu	Ser	Val	Gln	Asn	Glu	Ile	Tyr	Glu	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val		
			1030					1035					1040			
gca	aaa	tct	gtt	aaa	gga	gag	gag	gaa	att	cct	gat	ggt	gct	gtt		3272
Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Gly	Ala	Val		
			1045					1050					1055			
gcc	ctg	ata	aca	cca	gac	atg	cca	gat	gtt	ctt	tca	cat	gtt	tct		3317
Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser		
			1060					1065					1070			
gtt	cga	gct	aga	aat	ggg	aag	gtt	tgc	ttt	gct	aca	tgc	ttt	gat		3362
Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Gly	Lys	Val	Cys	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp		
			1075					1080					1085			
ccc	aat	ata	ttg	gct	gac	ctc	caa	gca	aag	gaa	gga	agg	att	ttg		3407
Pro	Asn	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Lys	Glu	Gly	Arg	Ile	Leu		
			1090					1095					1100			
ctc	tta	aag	cct	aca	cct	tca	gac	ata	atc	tat	agt	gag	gtg	aat		3452
Leu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Asn		
			1105					1110					1115			
gag	att	gag	ctc	caa	agt	tca	agt	aac	ttg	gta	gaa	gct	gaa	act		3497
Glu	Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Thr		
			1120					1125					1130			
tca	gca	aca	ctt	aga	ttg	gtg	aaa	aag	caa	ttt	ggt	ggt	tgt	tac		3542
Ser	Ala	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	Lys	Lys	Gln	Phe	Gly	Gly	Cys	Tyr		
			1135					1140					1145			
gca	ata	tca	gca	gat	gaa	ttc	aca	agt	gaa	atg	gtt	gga	gct	aaa		3587
Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Glu	Phe	Thr	Ser	Glu	Met	Val	Gly	Ala	Lys		
			1150					1155					1160			
tca	cgt	aat	att	gca	tat	ctg	aaa	gga	aaa	gtg	cct	tcc	tcg	gtg		3632
Ser	Arg	Asn	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Ser	Val		
			1165					1170					1175			
gga	att	cct	acg	tca	gta	gct	ctt	cca	ttt	gga	gtc	ttt	gag	aaa		3677
Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	Gly	Val	Phe	Glu	Lys		
			1180					1185					1190			
gta	ctt	tca	gac	gac	ata	aat	cag	gga	gtg	gca	aaa	gag	ttg	caa		3722
Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Ile	Asn	Gln	Gly	Val	Ala	Lys	Glu	Leu	Gln		
			1195					1200					1205			
att	ctg	atg	aaa	aaa	cta	tct	gaa	gga	gac	ttc	agc	gct	ctt	ggt		3767
Ile	Leu	Met	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Gly	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly		
			1210					1215					1220			
gaa	att	cgc	aca	acg	gtt	tta	gat	ctt	tca	gca	cca	gct	caa	ttg		3812
Glu	Ile	Arg	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu		
			1225					1230					1235			

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc aaa gag ctg aag gag aag atg cag ggt tct ggc atg cct tgg Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp 1240 1245 1250	3857
cct ggt gat gaa ggt cca aag cgg tgg gaa caa gca tgg atg gcc Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala 1255 1260 1265	3902
ata aaa aag gtg tgg gct tca aaa tgg aat gag aga gca tac ttc Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe 1270 1275 1280	3947
agc aca agg aag gtg aaa ctg gat cat gac tat ctg tgc atg gct Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala 1285 1290 1295	3992
gtc ctt gtt caa gaa ata ata aat gct gat tat gca ttt gtc att Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile 1300 1305 1310	4037
cac aca acc aac cca tct tcc gga gac gac tca gaa ata tat gcc His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala 1315 1320 1325	4082
gag gtg gtc agg ggc ctt ggg gaa aca ctt gtt gga gct tat cca Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro 1330 1335 1340	4127
gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag aaa aag gat ctc aac tct Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser 1345 1350 1355	4172
cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg atc ggc ctt ttc ata Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile 1360 1365 1370	4217
aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat ggg gaa gat ttg Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu 1375 1380 1385	4262
gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta cca atg gat Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp 1390 1395 1400	4307
gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca ttg ata Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile 1405 1410 1415	4352
act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct cgt Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg 1420 1425 1430	4397
gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac att Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile 1435 1440 1445	4442
gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg 1450 1455 1460	4487
cca cag atg tga ttatatctc gttgtatggt gttcagagaa gaccacagat Pro Gln Met	4539
gtgatcatat tctcattgta tcagatctgt gaccacttac ctgatacctc ccatgaagtt	4599
acctgtatga ttatacgtga tccaaagcca tcacatcatg ttcaccttca gctattggag	4659



BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gagaagtgag aagtaggaat tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta 4719  
aattagctgg gatatatata gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac 4779  
acacgcatta tgtattgcat tatgcactga ataatatcgc agcatcaaag aagaaatcct 4839  
ttgggtggtt tc 4851

<210> 11

<211> 1464

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr  
1 5 10 15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly  
20 25 30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser  
35 40 45

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro  
50 55 60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr  
65 70 75 80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn  
85 90 95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser  
100 105 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His  
115 120 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp  
130 135 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro  
145 150 155 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp  
165 170 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp  
180 185 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg  
 195 200 205  
 Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln  
 210 215 220  
 Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln  
 245 250 255  
 Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu  
 260 265 270  
 Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val  
 275 280 285  
 Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile  
 290 295 300  
 Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys  
 325 330 335  
 Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile  
 340 345 350  
 Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu  
 355 360 365  
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr  
 370 375 380  
 Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile  
 405 410 415  
 Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu  
 420 425 430  
 Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu  
 435 440 445  
 Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys  
 450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly  
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser  
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu  
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys  
515 520 525

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala  
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys  
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser  
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr  
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe  
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro  
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn  
625 630 635 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met  
645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg  
660 665 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met  
675 680 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp  
690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp  
705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu  
725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg  
740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg  
755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala  
770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val  
785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu  
805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu  
820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Lys  
835 840 845

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp  
850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn  
865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn  
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys  
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp  
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala  
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr  
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr  
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu  
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp  
995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val  
 1010 1015 1020  
 Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr  
 1025 1030 1035  
 Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp  
 1040 1045 1050  
 Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser  
 1055 1060 1065  
 His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr  
 1070 1075 1080  
 Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly  
 1085 1090 1095  
 Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser  
 1100 1105 1110  
 Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu  
 1115 1120 1125  
 Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly  
 1130 1135 1140  
 Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val  
 1145 1150 1155  
 Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro  
 1160 1165 1170  
 Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val  
 1175 1180 1185  
 Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys  
 1190 1195 1200  
 Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser  
 1205 1210 1215  
 Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro  
 1220 1225 1230  
 Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly  
 1235 1240 1245  
 Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala  
 1250 1255 1260

Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg  
1265 1270 1275

Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu  
1280 1285 1290

Cys Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala  
1295 1300 1305

Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu  
1310 1315 1320

Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly  
1325 1330 1335

Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp  
1340 1345 1350

Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly  
1355 1360 1365

Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly  
1370 1375 1380

Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val  
1385 1390 1395

Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp  
1400 1405 1410

Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn  
1415 1420 1425

Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro  
1430 1435 1440

Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val  
1445 1450 1455

Gln Thr Arg Pro Gln Met  
1460

<210> 12  
<211> 4576  
<212> DNA  
<213> Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20)..(4393)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; NCBI / AR400814

&lt;309&gt; 2003-12-18

&lt;400&gt; 12

cttacagata ttcgtgcag atg agc gga ttc tcc gcg gca gct gct gcg gcc	52
Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
1 5 10	
gag cgg tgc gcg ctc ggc ctc ggc gtc cac gcg cgc ccc gcc tcg ccc	100
Glu Arg Cys Ala Leu Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro	
15 20 25	
tcg ccg gcg ctg ctc ccg ccg gcg gct ctc cgc cgc gcc cgc cgt ctc	148
Ser Pro Ala Leu Leu Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu	
30 35 40	
ccc gcg gcc acc acc acc ctc gcc gtc tcc cgt ccg agc ctc ctc gcc	196
Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala	
45 50 55	
cct cgc gcc atc gcc gct tcc acc ggc cgc gcc tcc ccg gcc ctt gtc	244
Pro Arg Ala Ile Ala Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val	
60 65 70 75	
gga agg ttc acc ctg gat gcc aac tcc gag ctt aag gtg aca ttg aac	292
Gly Arg Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn	
80 85 90	
cca gca ccg cag ggt tcg gtg gtg gag atc aat cta gag gca act aac	340
Pro Ala Pro Gln Gly Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn	
95 100 105	
acc agc ggc tcc ctg ata ctg cat tgg ggc gcc ctt cgc ccg gat aga	388
Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg	
110 115 120	
gga gaa tgg ctc cta cca tcc ccg aaa cca gat ggc acg aca gtg tac	436
Gly Glu Trp Leu Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr	
125 130 135	
aag aac agg gct ctt agg acg cct ttt ata aag tca ggt gat aac tcc	484
Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser	
140 145 150 155	
acg ctg aaa att gag ata gat gat cct gca gtg caa gcc att gag ttc	532
Thr Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe	
160 165 170	
ctc ata ttt gat gag gca ccg aat aat tgg tac aaa aac aat ggc cag	580
Leu Ile Phe Asp Glu Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln	
175 180 185	
aat ttc caa att cag cta caa gcg agc caa tat caa ggg cag ggt aca	628

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Asn Phe Gln Ile Gln Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr  
 190 195 200

tct Ser	act Thr	gct Ala	act Thr	tct Ser	tct Ser	act Thr	gtg Val	gtt Val	cca Pro	gag Glu	gat Asp	ctt Leu	gtg Val	cag Gln	ata Ile	676
205						210					215					
caa Gln	tca Ser	tat Tyr	ctt Leu	cgg Arg	tgg Trp	gaa Glu	aga Arg	aag Lys	gga Gly	aag Lys	cag Gln	tca Ser	tat Tyr	aca Thr	cct Pro	724
220					225					230					235	
gag Glu	caa Gln	gag Glu	aag Lys	gag Glu	gag Glu	tat Tyr	gaa Glu	gca Ala	gca Ala	cga Arg	act Thr	gag Glu	ttg Leu	ata Ile	gag Glu	772
				240					245					250		
gaa Glu	tta Leu	aac Asn	aag Lys	ggt Gly	gtt Val	tct Ser	ttg Leu	gag Glu	aag Lys	cta Leu	cga Arg	gcg Ala	aaa Lys	ctg Leu	aca Thr	820
			255					260					265			
aag Lys	aca Thr	cct Pro	gag Glu	gca Ala	act Thr	gat Asp	agt Ser	aat Asn	gct Ala	cct Pro	gca Ala	tct Ser	gaa Glu	agc Ser	act Thr	868
		270					275						280			
gtg Val	act Thr	act Thr	aaa Lys	gtc Val	cca Pro	gag Glu	gaa Glu	ctt Leu	gta Val	caa Gln	gtc Val	cag Gln	gct Ala	tac Tyr	ata Ile	916
	285					290						295				
agg Arg	tgg Trp	gag Glu	aaa Lys	gca Ala	ggc Gly	aag Lys	cca Pro	aat Asn	tat Tyr	gcc Ala	cca Pro	gag Glu	aag Lys	caa Gln	ttg Leu	964
300					305					310					315	
gtc Val	gag Glu	ttt Phe	gag Glu	gaa Glu	gca Ala	agg Arg	aag Lys	gaa Glu	ctg Leu	cag Gln	tct Ser	gag Glu	ttg Leu	gat Asp	aag Lys	1012
				320					325					330		
ggg Gly	acc Thr	tca Ser	gtt Val	gag Glu	cag Gln	ttg Leu	agg Arg	aac Asn	aaa Lys	att Ile	ttg Leu	aaa Lys	ggg Gly	aac Asn	att Ile	1060
			335					340					345			
gag Glu	aca Thr	aaa Lys	gtt Val	tcc Ser	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	aag Lys	gac Asp	aaa Lys	aaa Lys	tac Tyr	ttt Phe	tct Ser	gtg Val	1108
		350					355					360				
gaa Glu	aga Arg	att Ile	cag Gln	cgg Arg	aaa Lys	aaa Lys	cga Arg	gat Asp	att Ile	gtg Val	caa Gln	cta Leu	ctt Leu	aaa Lys	aaa Lys	1156
	365					370					375					
cac His	aag Lys	cct Pro	act Thr	gtt Val	atg Met	gaa Glu	gcg Ala	caa Gln	gta Val	gag Glu	act Thr	cct Pro	aaa Lys	caa Gln	ccc Pro	1204
					385					390					395	
act Thr	gtt Val	ctg Leu	gat Asp	ctc Leu	ttc Phe	aca Thr	aag Lys	tca Ser	tta Leu	cag Gln	gag Glu	cag Gln	gat Asp	aac Asn	tgt Cys	1252
				400					405					410		
gag Glu	gtt Val	cta Leu	agc Ser	aga Arg	aag Lys	ctt Leu	ttc Phe	aag Lys	ttc Phe	ggt Gly	gac Asp	aag Lys	gag Glu	ata Ile	ctg Leu	1300
			415					420					425			
gga Gly	att Ile	acc Thr	acc Thr	gtt Val	gct Ala	cta Leu	gga Gly	aaa Lys	acc Thr	aaa Lys	gtt Val	cac His	ttg Leu	gca Ala	aca Thr	1348
		430					435					440				
aac Asn	tat Tyr	atg Met	gag Glu	cca Pro	ctt Leu	ata Ile	ctt Leu	cac His	tgg Trp	gcg Ala	ttg Leu	tca Ser	aaa Lys	gag Glu	aat Asn	1396
	445					450					455					
gga Glu	gag Glu	tgg Trp	cag Glu	gca Ala	cct Pro	ccc Pro	tca Ala	agc Arg	ata Ile	ttg Leu	cca Ala	tct Ser	ggt Glu	tca Ala	tca Ala	1444



Gly 460	Glu	Trp	Gln	Ala	Pro 465	Pro	Ser	Ser	Ile	Leu 470	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser 475	
ttg	cta	gac	aag	gca	tgt	gaa	act	tca	ttc	agt	gaa	tat	gaa	ttg	aat	1492
Leu	Leu	Asp	Lys	Ala 480	Cys	Glu	Thr	Ser	Phe 485	Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu 490	Asn	
ggg	ctg	cat	tgt	cag	gtt	gtt	gag	atc	gag	ctt	gac	gat	ggg	gga	tac	1540
Gly	Leu	His	Cys 495	Gln	Val	Val	Glu	Ile 500	Glu	Leu	Asp	Asp	Gly 505	Gly	Tyr	
aag	cgg	atg	ccc	ttt	gtt	ctc	cgg	tct	ggg	gaa	aca	tgg	atg	aaa	aat	1588
Lys	Arg	Met 510	Pro	Phe	Val	Leu	Arg 515	Ser	Gly	Glu	Thr	Trp 520	Met	Lys	Asn	
aat	ggc	tct	gac	ttt	tac	ttg	gat	ttc	agc	acc	aaa	gtt	gca	aaa	aat	1636
Asn	Gly 525	Ser	Asp	Phe	Tyr	Leu 530	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys 535	Val	Ala	Lys	Asn	
aca	aag	gat	act	ggg	gat	gct	ggg	aaa	ggc	act	gct	gag	gcc	ttg	ctt	1684
Thr	Lys	Asp	Thr	Gly 545	Asp	Ala	Gly	Lys	Gly	Thr 550	Ala	Glu	Ala	Leu 555	Leu	
gaa	aga	ata	gca	gat	cta	gag	gaa	gat	gcc	caa	cga	tct	ctt	atg	cac	1732
Glu	Arg	Ile	Ala 560	Asp	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala 565	Gln	Arg	Ser	Leu	Met 570	His	
aga	ttc	aat	att	gca	gca	gat	cta	gtt	gac	caa	gcg	aga	gat	aat	gga	1780
Arg	Phe	Asn	Ile 575	Ala	Ala	Asp	Leu	Val 580	Asp	Gln	Ala	Arg	Asp 585	Asn	Gly	
tta	ttg	ggg	att	att	gga	att	ttt	gtt	tgg	att	ggg	ttc	atg	gct	aca	1828
Leu	Leu	Gly 590	Ile	Ile	Gly	Ile	Phe 595	Val	Trp	Ile	Gly	Phe 600	Met	Ala	Thr	
agg	caa	cta	ata	tgg	aac	aag	aac	tac	aat	gtg	aag	cca	cgt	gag	ata	1876
Arg	Gln 605	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys 610	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys 615	Pro	Arg	Glu	Ile	
agc	aaa	gcc	caa	gat	agg	ttt	aca	gat	gat	ctt	gag	aat	atg	tac	aga	1924
Ser 620	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg 625	Phe	Thr	Asp	Asp	Leu 630	Glu	Asn	Met	Tyr	Arg 635	
act	tac	cca	caa	tat	cag	gag	atc	tta	aga	atg	ata	atg	tct	gct	gtt	1972
Thr	Tyr	Pro	Gln	Tyr 640	Gln	Glu	Ile	Leu	Arg 645	Met	Ile	Met	Ser	Ala 650	Val	
ggg	cgg	gga	ggg	gaa	ggg	gat	gtt	ggg	caa	cgc	att	cgt	gat	gag	ata	2020
Gly	Arg	Gly	Gly 655	Glu	Gly	Asp	Val	Gly 660	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp 665	Glu	Ile	
tta	gta	atc	cag	aga	aat	aat	gac	tgc	aaa	ggg	gga	atg	atg	gag	gag	2068
Leu	Val	Ile 670	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp 675	Cys	Lys	Gly	Gly	Met 680	Met	Glu	Glu	
tgg	cac	cag	aaa	ctg	cac	aac	aat	aca	agc	cca	gat	gat	gta	gtg	atc	2116
Trp	His 685	Gln	Lys	Leu	His	Asn 690	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp 695	Asp	Val	Val	Ile	
tgc	cag	gcc	cta	ctt	gat	tat	atc	aag	agt	gat	ttt	gat	act	ggg	gtt	2164
Cys 700	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp 705	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp 710	Phe	Asp	Thr	Gly 715	Val	
tac	tgg	gac	acc	ttg	aaa	aaa	ggg	ggg	ata	aca	aaa	gag	cgt	cta	ttg	2212
Tyr	Trp	Asp	Thr	Leu 720	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile 725	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu 730	Leu	
agc	tat	gat	cga	ccg	att	cat	tca	gag	cca	aat	ttc	agg	agt	gaa	cag	2260

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Ser Tyr Asp Arg Pro Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln  
 735 740 745

aaa gat agc tta ctc cgt gac ttg ggc aat tat atg aga agc ctc aag Lys Asp Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys 750 755 760	2308
gca gtg cat tct ggt gct gat ctt gaa tct gct ata gca act tgc atg Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met 765 770 775	2356
gga tac aaa tca gag ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag att aat Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn 780 785 790 795	2404
cca gtg aag ggt ttg cca tct gga ttt cct aaa ttg ctt gaa ttt ata Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile 800 805 810	2452
ctt gac cat gtt gag gat aaa tca gca aga cca ctt ctt gga ggg tta Leu Asp His Val Glu Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu 815 820 825	2500
ttg gag gct cga gct gaa cta cac cct ttg ctc ctt ggc tct cct gaa Leu Glu Ala Arg Ala Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu 830 835 840	2548
cgc atg aag gat ctt atc ttt tta gac att gct ctt gat tct act ttc Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe 845 850 855	2596
agg aca gca gtc gaa aga tca tat gag gag ctc aat aat gta gaa cca Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro 860 865 870 875	2644
gag aaa att atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gct tta Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu 880 885 890	2692
tcc acc gac gac aat gaa gat atc cta tat tgc tta aag gga tgg aat Ser Thr Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn 895 900 905	2740
caa gcc gtg gaa atg gct aaa cag aaa aac aac caa tgg gct ctc tat Gln Ala Val Glu Met Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr 910 915 920	2788
gct aaa gca ttt ctg gac aga acc aga ctt gcc ctt gca agc aag gga Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly 925 930 935	2836
gaa caa tac tat aat ttg atg cag ccc tca gct gaa tat ctt ggc tcg Glu Gln Tyr Tyr Asn Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser 940 945 950 955	2884
tta ctt aac att gac caa tgg gca gtt aat atc ttt aca gaa gaa att Leu Leu Asn Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile 960 965 970	2932
att cgt ggt gga tca gct gct acc ctg tct gct ctt ctg aat cgg att Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile 975 980 985	2980
gat cct gtt ctt agg aat gtt gca cag ctt gga agt tgg cag gtt ata Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 990 995 1000	3028
agc cca gtt gaa gta tca ggt tac att gta gtg gtt gat gaa ttg	3073

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Asp	Glu	Leu	
1005						1010						1015			
ctt	gct	gtt	caa	aac	aaa	tcc	tat	gat	aaa	cca	act	atc	ctt	gtg	3118
Leu	Ala	Val	Gln	Asn	Lys	Ser	Tyr	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	
1020						1025					1030				
gca	aag	agt	gtc	aag	gga	gag	gaa	gaa	ata	cca	gat	gga	gtt	gtt	3163
Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Gly	Val	Val	
1035						1040					1045				
ggt	gtt	att	aca	cct	gat	atg	cca	gat	gtt	ctc	tcc	cat	gta	tca	3208
Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser	
1050						1055					1060				
gtc	cga	gca	agg	aat	tgc	aag	gtt	tta	ttt	gca	aca	tgc	ttt	gat	3253
Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Cys	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp	
1065						1070					1075				
cct	aac	acc	ttg	tct	gaa	ctc	caa	gga	cat	gat	ggg	aaa	gtg	ttt	3298
Pro	Asn	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	
1080						1085					1090				
tcc	ttc	aaa	cct	act	tct	gca	gat	atc	acc	tat	agg	gag	att	cca	3343
Ser	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ile	Pro	
1095						1100					1105				
gag	agt	gaa	ctg	caa	tca	ggt	tct	cta	aat	gca	gaa	gct	ggc	cag	3388
Glu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Leu	Asn	Ala	Glu	Ala	Gly	Gln	
1110						1115					1120				
gca	gtg	cca	tct	gtg	tca	tta	gtc	aag	aag	aag	ttt	ctt	gga	aaa	3433
Ala	Val	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	
1125						1130					1135				
tat	gca	ata	tca	gca	gaa	gaa	ttc	tct	gag	gaa	atg	gtt	ggg	gcc	3478
Tyr	Ala	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Met	Val	Gly	Ala	
1140						1145					1150				
aag	tct	cgc	aac	gta	gca	tac	ctc	aaa	gga	aaa	gta	ccc	tca	tgg	3523
Lys	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Trp	
1155						1160					1165				
gtt	ggt	gtc	cct	aca	tca	gtt	gcg	att	cca	ttt	ggg	acc	ttt	gag	3568
Val	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Phe	Gly	Thr	Phe	Glu	
1170						1175					1180				
aag	gtt	ttg	tct	gat	gaa	atc	aat	aag	gaa	gtc	gcg	caa	acc	ata	3613
Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Ile	Asn	Lys	Glu	Val	Ala	Gln	Thr	Ile	
1185						1190					1195				
caa	atg	ctg	aag	gga	aaa	ctt	gct	caa	gat	gat	ttt	agt	gct	cta	3658
Gln	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Ala	Gln	Asp	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	
1200						1205					1210				
ggc	gaa	ata	cgg	aaa	act	gtt	ctc	aat	tta	act	gct	cct	act	caa	3703
Gly	Glu	Ile	Arg	Lys	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Gln	
1215						1220					1225				
ctg	atc	aag	gaa	ctg	aag	gag	aag	atg	cta	ggc	tct	gga	atg	ccc	3748
Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	
1230						1235					1240				
tgg	cct	gga	gat	gaa	ggt	gac	caa	cgt	tgg	gag	caa	gca	tgg	atg	3793
Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Gln	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala	Trp	Met	
1245						1250					1255				
gca	att	aaa	aag	gtt	tgg	gcg	tca	aaa	tgg	aat	gaa	aga	gca	tat	3838

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala Ile	Lys Lys Val Trp	Ala Ser Lys Trp Asn	Glu Arg Ala Tyr	
1260		1265	1270	
ttt agc act cgt aag gtg aag ctt gat cat gac tac ctt tcc atg				3883
Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met				
1275		1280	1285	
gct gta ctt gta caa gaa att gtc aat gca gac tat gcc ttt gtc				3928
Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val				
1290		1295	1300	
att cat act act aac cca tca tcg gga gat tcg tct gag ata tat				3973
Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr				
1305		1310	1315	
gct gaa gtg gtg aaa ggg ctt gga gaa aca ctt gta gga gcc tat				4018
Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr				
1320		1325	1330	
cct ggt cgc gcc atg agc ttt gta tgt aag aaa aac gac ctt gac				4063
Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp				
1335		1340	1345	
tct ccc aag gta ctg ggt ttc cca agc aag cca att ggt gtc ttc				4108
Ser Pro Lys Val Leu Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe				
1350		1355	1360	
ata aag aga tca atc atc ttt cgt tcg gat tcc aac ggt gag gat				4153
Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp				
1365		1370	1375	
tta gaa ggg tat gct gga gca aga ctg tat gat agt gtc cct atg				4198
Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met				
1380		1385	1390	
gat gag gaa gat gaa gtc ata gtc gac tac aac aac gga ccc ctc				4243
Asp Glu Glu Asp Glu Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu				
1395		1400	1405	
att aca gat cag gga ttc caa aaa tcc aac ctc ccg agc att gca				4288
Ile Thr Asp Gln Gly Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala				
1410		1415	1420	
ccg gct ggt cat gcc att gag gag ctt tat ggg tcc cca cag gat				4333
Pro Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp				
1425		1430	1435	
gtt gag ggt gca gtg aag gaa ggg aag cta tac gta gta cag aca				4378
Val Glu Gly Ala Val Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr				
1440		1445	1450	
aga cca cag atg taa tctatatgta tatttttatag ccaagtcaat caggcaatgt				4433
Arg Pro Gln Met				
1455				
tgtagagtaa gatatacggg ccgtgggaca tgtataacac gttacgccct tttttttatt				4493
atttgctttc atactcaciaa tacactaatt tatagggtt attttatcgc caaaaaaaaaa				4553
aaaaaaaaaga aaaaaaaaaa aaa				4576

<210> 13

<211> 1457

<212> PRT

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
<213> Oryza sativa

<400> 13

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu  
1 5 10 15  
Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro Ser Pro Ala Leu Leu  
20 25 30  
Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr  
35 40 45  
Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala  
50 55 60  
Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val Gly Arg Phe Thr Leu  
65 70 75 80  
Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly  
85 90 95  
Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu  
100 105 110  
Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu  
115 120 125  
Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu  
130 135 140  
Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu  
145 150 155 160  
Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu  
165 170 175  
Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Ile Gln  
180 185 190  
Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser  
195 200 205  
Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg  
210 215 220  
Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu  
225 230 235 240  
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly  
245 250 255

Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala  
 260 265 270  
 Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val  
 275 280 285  
 Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala  
 290 295 300  
 Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu  
 325 330 335  
 Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser  
 340 345 350  
 Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg  
 355 360 365  
 Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val  
 370 375 380  
 Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg  
 405 410 415  
 Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val  
 420 425 430  
 Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro  
 435 440 445  
 Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala  
 450 455 460  
 Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala  
 465 470 475 480  
 Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln  
 485 490 495  
 Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe  
 500 505 510  
 Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe  
 515 520 525

Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly  
 530 535 540  
 Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Glu Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp  
 545 550 555 560  
 Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala  
 565 570 575  
 Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile  
 580 585 590  
 Gly Ile Phe Val Trp Ile Gly Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp  
 595 600 605  
 Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp  
 610 615 620  
 Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr  
 625 630 635 640  
 Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu  
 645 650 655  
 Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg  
 660 665 670  
 Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu  
 675 680 685  
 His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu  
 690 695 700  
 Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Thr Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu  
 705 710 715 720  
 Lys Lys Gly Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro  
 725 730 735  
 Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Asp Ser Leu Leu  
 740 745 750  
 Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly  
 755 760 765  
 Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu  
 770 775 780  
 Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu  
 785 790 795 800

Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile Leu Asp His Val Glu  
805 810 815

Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Glu Ala Arg Ala  
820 825 830

Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu Arg Met Lys Asp Leu  
835 840 845

Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Val Glu  
850 855 860

Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro Glu Lys Ile Met Tyr  
865 870 875 880

Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr Asp Asp Asn  
885 890 895

Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Val Glu Met  
900 905 910

Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu  
915 920 925

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr Tyr Asn  
930 935 940

Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Asn Ile Asp  
945 950 955 960

Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser  
965 970 975

Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg  
980 985 990

Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val  
995 1000 1005

Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn  
1010 1015 1020

Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys  
1025 1030 1035

Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro  
1040 1045 1050

Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn  
1055 1060 1065



Cys Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser  
 1070 1075 1080  
 Glu Leu Gln Gly His Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr  
 1085 1090 1095  
 Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln  
 1100 1105 1110  
 Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val  
 1115 1120 1125  
 Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala  
 1130 1135 1140  
 Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Val  
 1145 1150 1155  
 Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr  
 1160 1165 1170  
 Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp  
 1175 1180 1185  
 Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met Leu Lys Gly  
 1190 1195 1200  
 Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys  
 1205 1210 1215  
 Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu Leu  
 1220 1225 1230  
 Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu  
 1235 1240 1245  
 Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val  
 1250 1255 1260  
 Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys  
 1265 1270 1275  
 Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln  
 1280 1285 1290  
 Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn  
 1295 1300 1305  
 Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys  
 1310 1315 1320

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met  
 1325 1330 1335

Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu  
 1340 1345 1350

Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe Ile Lys Arg Ser Ile  
 1355 1360 1365

Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala  
 1370 1375 1380

Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu  
 1385 1390 1395

Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu Ile Thr Asp Gln Gly  
 1400 1405 1410

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala Pro Ala Gly His Ala  
 1415 1420 1425

Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Ala Val  
 1430 1435 1440

Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met  
 1445 1450 1455

<210> 14

<211> 4745

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(4482)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400815

<309> 2003-12-18

<400> 14

gcaccagcct ctccccattt tcacgtgatt cccaattctca cactcttctc acaccttcaa

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ccgattcaac gcaacaaagt gataaagtgt ggatccggga ag atg agc cag agt	114
Met Ser Gln Ser	
1	
atc ttc cac cag acg gtg ctt tgt caa acg caa acg gtt gcg gag cat	162
Ile Phe His Gln Thr Val Leu Cys Gln Thr Gln Thr Val Ala Glu His	
5 10 15 20	
caa agt aag gtt agt tcc ttg gag gtg agt gcg aac aaa gga aag aag	210
Gln Ser Lys Val Ser Ser Leu Glu Val Ser Ala Asn Lys Gly Lys Lys	
25 30 35	
aac ctc ttt ttg gct cct aca aat ttt cgc ggg agc agg ctg tgt gtg	258
Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser Arg Leu Cys Val	
40 45 50	
agg aaa cgc aaa tta acc atg gga agg cac cac cac cgc cac gtt gac	306
Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His Arg His Val Asp	
55 60 65	
gct gtt cca cgc gct gtt tta acc acc aat ctg gct tct gag ctt tct	354
Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Glu Leu Ser	
70 75 80	
ggg aag ttc aac ctt gac gga aat att gag ttg cag att gct gtt agt	402
Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln Ile Ala Val Ser	
85 90 95 100	
tct tca gaa cca gga gct gca aga caa gta gat ttt aag gtt tca tat	450
Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe Lys Val Ser Tyr	
105 110 115	
aat agt gag tct ctg ctt tta cat tgg gga gtt gtg cgt gat cag cca	498
Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val Arg Asp Gln Pro	
120 125 130	
ggg aag tgg gtt ctt cct tct cgt cac cca gat gga act aaa aat tat	546
Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly Thr Lys Asn Tyr	
135 140 145	
aag agc aga gct ctt aga act cct ttt gtg aaa tcc gac tca gga tct	594
Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Asp Ser Gly Ser	
150 155 160	
ttc ctt aaa ata gaa att gac gat cct gct gca caa gcc att gag ttc	642
Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln Ala Ile Glu Phe	
165 170 175 180	
ctc ata ctt gat gag gct aag aat aag tgg ttt aag aat aat ggt gag	690
Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Glu	
185 190 195	
aac ttt cac atc aag tta cca gta aaa agc aag cta tct caa gaa gtt	738
Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu Ser Gln Glu Val	
200 205 210	
tca gtt cct gaa gac ctt gta cag att caa gca tat ctt agg tgg gaa	786
Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu	
215 220 225	
cga aag ggt aag cag atg tac act cca gag caa gag aag gag gaa tat	834
Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr	
230 235 240	
gaa gca gct cgg aat gaa cta ttg gag gaa gta gcc agg ggt act tct	882
Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala Arg Gly Thr Ser	
245 250 255 260	

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg	cga	gat	ctc	cat	gca	agg	tta	act	aag	aaa	act	aaa	gct	gcc	gaa	930
Val	Arg	Asp	Leu	His	Ala	Arg	Leu	Thr	Lys	Lys	Thr	Lys	Ala	Ala	Glu	
				265					270					275		
gta	aag	gag	cct	tct	gtt	tct	gaa	aca	aag	acc	atc	cct	gat	gaa	ctt	978
Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Val	Ser	Glu	Thr	Lys	Thr	Ile	Pro	Asp	Glu	Leu	
			280					285					290			
gta	cag	att	caa	gct	ttt	ata	cga	tgg	gaa	aaa	gct	ggg	aag	cct	aac	1026
Val	Gln	Ile	Gln	Ala	Phe	Ile	Arg	Trp	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Pro	Asn	
		295					300					305				
tac	tct	cgg	gaa	caa	caa	ctt	atg	gaa	ttt	gag	gaa	gca	aga	aaa	gaa	1074
Tyr	Ser	Arg	Glu	Gln	Gln	Leu	Met	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Glu	
	310					315					320					
ttg	tta	gaa	gag	ctt	gag	aag	ggg	gct	tct	ctg	gat	gcg	ata	cgg	aag	1122
Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Ser	Leu	Asp	Ala	Ile	Arg	Lys	
				330						335					340	
aag	att	gtc	aaa	gga	gag	ata	caa	act	aaa	gtt	gcc	aag	caa	ttg	aaa	1170
Lys	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Ile	Gln	Thr	Lys	Val	Ala	Lys	Gln	Leu	Lys	
				345					350					355		
acc	aaa	aaa	tac	ttt	cgt	gct	gaa	aga	ata	cag	agg	aaa	aag	aga	gat	1218
Thr	Lys	Lys	Tyr	Phe	Arg	Ala	Glu	Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Arg	Asp	
			360					365					370			
ttg	atg	cag	ctt	atc	aac	cga	aat	gtt	gca	caa	aat	ata	gtt	gaa	caa	1266
Leu	Met	Gln	Leu	Ile	Asn	Arg	Asn	Val	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Glu	Gln	
		375					380					385				
gtt	ata	gat	gct	cca	aaa	gcc	ttg	aca	gta	att	gaa	cat	tat	gcc	aat	1314
Val	Ile	Asp	Ala	Pro	Lys	Ala	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	His	Tyr	Ala	Asn	
		390				395					400					
gca	agg	gaa	gaa	tat	gaa	agt	ggg	cct	gtt	ttg	aat	aag	aca	ata	tac	1362
Ala	Arg	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Asn	Lys	Thr	Ile	Tyr	
				410						415					420	
aag	ctt	ggg	gat	aat	tat	ctt	ctg	gtc	ctt	gtt	acc	aag	gat	gct	ggc	1410
Lys	Leu	Gly	Asp	Asn	Tyr	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	
				425					430					435		
aag	att	aag	gtt	cac	cta	gct	aca	gac	tcg	aaa	aaa	cct	ttt	aca	ctt	1458
Lys	Ile	Lys	Val	His	Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Lys	Lys	Pro	Phe	Thr	Leu	
			440					445					450			
cac	tgg	gcc	tta	tct	aga	aca	tct	gaa	gag	tgg	ttg	gta	cca	cct	gaa	1506
His	Trp	Ala	Leu	Ser	Arg	Thr	Ser	Glu	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Pro	Glu	
		455					460					465				
act	gct	ctg	ccc	cct	gga	tct	gtt	act	atg	aat	gag	gcc	gct	gaa	aca	1554
Thr	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Met	Asn	Glu	Ala	Ala	Glu	Thr	
					475						480					
cct	ttc	aaa	gct	ggg	tct	tcg	tct	cat	cct	tct	tat	gag	gtc	cag	tcc	1602
Pro	Phe	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Ser	
				490						495					500	
ttg	gat	ata	gag	gtt	gat	gat	gat	act	ttt	aaa	gga	ata	cct	ttt	gtc	1650
Leu	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Asp	Asp	Thr	Phe	Lys	Gly	Ile	Pro	Phe	Val	
				505					510					515		
att	ctg	tcg	gat	gga	gaa	tgg	ata	aag	aac	aat	gga	tca	aat	ttt	tat	1698
Ile	Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Trp	Ile	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Asn	Phe	Tyr	
			520					525					530			

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

att gaa ttt ggt ggg aag aag cag aaa cag aag gat ttt ggc aat ggc Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp Phe Gly Asn Gly 535 540 545	1746
aaa ggt aca gcc aag ttc ttg ttg aat aaa ata gca gaa atg gaa agt Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala Glu Met Glu Ser 550 555 560	1794
gag gca caa aag tcc ttc atg cat cga ttt aac att gca tca gat ttg Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ser Asp Leu 565 570 575 580	1842
ata gat gaa gcc aaa aat gct ggt caa ctg ggt ctt gcg ggg att ttg Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu Ala Gly Ile Leu 585 590 595	1890
gtg tgg atg aga ttc atg gct aca agg cag ctc ata tgg aac aaa aat Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn 600 605 610	1938
tac aat gtg aag cca cgt gag ata agt aaa gca cag gat agg ctt aca Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr 615 620 625	1986
gac ttg ctc caa gat gtt tat gca aat tat cca cag tat agg gaa att Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile 630 635 640	2034
gtg agg atg atc ttg tcc act gtt ggt cgt gga ggt gaa gga gat gtc Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val 645 650 660	2082
gga cag agg att cgg gat gaa atc ctt gtt atc cag aga aat aat gat Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp 665 670 675	2130
tgc aaa ggt gga atg atg gag gaa tgg cac cag aaa tta cac aat aat Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn 680 685 690	2178
act agt cct gat gat gtt gta atc tgt cag gca cta att gat tat ata Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile 695 700 705	2226
aat agt gac ttt gat att ggt gtt tac tgg aaa gca ttg aat gac aat Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala Leu Asn Asp Asn 710 715 720	2274
aga ata aca aaa gag cgg ctt ctg agc tat gac cgt gcc atc cat tct Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser 725 730 735 740	2322
gaa cca aat ttt agg aga gat cag aag gaa ggt ctt ctg cga gat ctg Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu Leu Arg Asp Leu 745 750 755	2370
gga aac tac atg agg act tta aag gca gtt cat tcc ggt gca gat ctt Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu 760 765 770	2418
gaa tct gct att tca aat tgt atg ggc tac aaa tct gag ggt cag ggc Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Gln Gly 775 780 785	2466
ttc atg gta ggg gtg aag ata aat cca gtg ccg ggt ttg cct act ggt Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Thr Gly 790 795 800	2514

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt cca gaa tta ctt gag ttt gtc atg gaa cac gtt gaa gag aag aat Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val Glu Glu Lys Asn 805 810 815 820	2562
gtt gaa cca ctt ctt gag ggg ttg ctt gag gct cgt cag gaa ctc caa Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Gln 825 830 835	2610
cca tca ctc agt aaa tcc caa agt cgt ctg aaa gat ctt ata ttt ttg Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp Leu Ile Phe Leu 840 845 850	2658
gat gtt gcc ctt gat tct aca gtt aga aca gca gtg gaa agg agt tat Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr 855 860 865	2706
gag gaa tta aac aat gct gga cct gag aaa ata atg tac ttc att agc Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser 870 875 880	2754
ttg gtt ctt gaa aat ctc gca ctt tca tcg gat gac aat gaa gat ctt Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asn Glu Asp Leu 885 890 900	2802
atc tac tgt ttg aag gga tgg gat gtt gcc tta agc atg tgc aag att Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser Met Cys Lys Ile 905 910 915	2850
aaa gat act cat tgg gca ttg tac gca aaa tca gtc ctt gac aga acc Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr 920 925 930	2898
cgt ctt gca cta aca aac aag gct cat tta tac cag gaa att ctg caa Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln Glu Ile Leu Gln 935 940 945	2946
cca tcg gca gaa tat ctt gga tca ctg ctt ggc gtg gac aaa tgg gcc Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val Asp Lys Trp Ala 950 955 960	2994
gtg gaa ata ttt act gaa gaa att atc cgt gct gga tct gct gct tct Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser 965 970 975 980	3042
ttg tct act ctt cta aat cga ctg gat cct gtg ctc cga aag aca gct Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala 985 990 995	3090
cat ctt gga agc tgg cag gtt att agt cca gtt gaa act gtt gga His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Thr Val Gly 1000 1005 1010	3135
tat gtt gag gtt gta gat gag ttg ctt act gtt caa aac aaa tca Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Ser 1015 1020 1025	3180
tat gag cga cct aca att ttg ata gcc aat agt gtg aaa gga gag Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu 1030 1035 1040	3225
gaa gaa att cca gat ggt aca gtt gct gtc ctg aca cct gat atg Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr Pro Asp Met 1045 1050 1055	3270
cct gat gtc cta tcc cat gtt tct gta cga gca aga aat agc aag Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys 1060 1065 1070	3315

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg tgt ttt gct aca tgc ttt gat ccc aat atc ctg gct aac ctc Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asn Leu	1075	1080	1085	3360
caa gaa tat aaa gga aag ctt tta cgc tta aag cct aca tct gct Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Pro Thr Ser Ala	1090	1095	1100	3405
gat gta gtt tat agt gag gtg aag gag ggt gag ttt att gat gac Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu Gly Glu Phe Ile Asp Asp	1105	1110	1115	3450
aaa tca act caa ctg aaa gat gtt ggt tct gtg tca ccc ata tct Lys Ser Thr Gln Leu Lys Asp Val Gly Ser Val Ser Pro Ile Ser	1120	1125	1130	3495
ctg gcc aga aag aag ttt agt ggt aga tat gct gtc tca tct gaa Leu Ala Arg Lys Lys Phe Ser Gly Arg Tyr Ala Val Ser Ser Glu	1135	1140	1145	3540
gaa ttc act ggt gaa atg gtt gga gct aaa tct cgt aat atc tct Glu Phe Thr Gly Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ser	1150	1155	1160	3585
tat tta aaa ggg aaa gta gct tct tgg att gga att cct acc tca Tyr Leu Lys Gly Lys Val Ala Ser Trp Ile Gly Ile Pro Thr Ser	1165	1170	1175	3630
gtt gcc ata cca ttt gga gtt ttt gaa cat gtt ctt tct gat aaa Val Ala Ile Pro Phe Gly Val Phe Glu His Val Leu Ser Asp Lys	1180	1185	1190	3675
cca aac cag gca gtg gct gag agg gtc aat aat ttg aaa aag aag Pro Asn Gln Ala Val Ala Glu Arg Val Asn Asn Leu Lys Lys Lys	1195	1200	1205	3720
tta act gag gga gac ttc agt gtt ctc aag gag att cgt gaa aca Leu Thr Glu Gly Asp Phe Ser Val Leu Lys Glu Ile Arg Glu Thr	1210	1215	1220	3765
gtt cta cag ttg aat gca cca tcc cag ttg gta gag gag ttg aaa Val Leu Gln Leu Asn Ala Pro Ser Gln Leu Val Glu Glu Leu Lys	1225	1230	1235	3810
act aaa atg aag agt tct gga atg ccg tgg ccg ggt gat gaa ggt Thr Lys Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly	1240	1245	1250	3855
gaa caa cga tgg gaa caa gct tgg ata gct ata aaa aag gtg tgg Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ile Ala Ile Lys Lys Val Trp	1255	1260	1265	3900
ggc tca aag tgg aat gaa aga gca tac ttc agc aca aga aaa gtg Gly Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val	1270	1275	1280	3945
aaa ctc gac cac gaa tat ctt tcc atg gca gtc ctg gtt cag gaa Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu	1285	1290	1295	3990
gtg ata aat gct gac tat gct ttt gtc atc cac aca act aac cct Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro	1300	1305	1310	4035
gcc tct gga gat tca tcg gaa ata tat gct gag gtg gta aag gga Ala Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly	1315	1320	1325	4080

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt gga gaa aca	ctg gtt gga gct	tat	cct ggt cgt gct	ttg	agt	4125
Leu Gly Glu Thr	Leu Val Gly Ala	Tyr	Pro Gly Arg Ala	Leu	Ser	
1330		1335		1340		
ttt atc tgc aag	aaa cgt gat ttg	aac	tct cct cag gtc	ttg	ggt	4170
Phe Ile Cys Lys	Lys Arg Asp Leu	Asn	Ser Pro Gln Val	Leu	Gly	
1345		1350		1355		
tat cct agc aaa	cct gtc ggc cta	ttt	ata aga cag tca	att	att	4215
Tyr Pro Ser Lys	Pro Val Gly Leu	Phe	Ile Arg Gln Ser	Ile	Ile	
1360		1365		1370		
ttc cga tct gat	tcc aat ggt gaa	gat	cta gaa ggt tat	gct	ggt	4260
Phe Arg Ser Asp	Ser Asn Gly Glu	Asp	Leu Glu Gly Tyr	Ala	Gly	
1375		1380		1385		
gca ggt ctt tat	gac agt gtg cca	atg	gat gaa gcc gag	aag	gtg	4305
Ala Gly Leu Tyr	Asp Ser Val Pro	Met	Asp Glu Ala Glu	Lys	Val	
1390		1395		1400		
gtg ctt gat tat	tca tca gac aaa	ctg	atc ctt gat ggt	agt	ttt	4350
Val Leu Asp Tyr	Ser Ser Asp Lys	Leu	Ile Leu Asp Gly	Ser	Phe	
1405		1410		1415		
cgc cag tca atc	ttg tcc agc att	gcc	cgt gca gga aat	gaa	att	4395
Arg Gln Ser Ile	Leu Ser Ser Ile	Ala	Arg Ala Gly Asn	Glu	Ile	
1420		1425		1430		
gaa gag ttg tat	ggc act cct cag	gac	att gaa ggt gtc	atc	aag	4440
Glu Glu Leu Tyr	Gly Thr Pro Gln	Asp	Ile Glu Gly Val	Ile	Lys	
1435		1440		1445		
gat ggc aaa gtc	tat gtt gtc cag	acc	aga cca caa atg	taa		4482
Asp Gly Lys Val	Tyr Val Val Gln	Thr	Arg Pro Gln Met			
1450		1455				
acttgcatatc ccatgtcttc	taagccacct	acctcaacta	tggtcatccc	cgagcaacac		4542
gtcgtttcaa acgtggccgt	ggcagcttct	gtgagttcaa	gagtaacccc	cggattacca		4602
aacatggcct tatagattta	ttacatgata	tattgaaaat	taaggaataa	gtgtataaaa		4662
acggaatatt gtaaattaag	aaaaatttag	acggtcttat	atattctttt	tcctactat		4722
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	aaa					4745

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1459

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Glycine max

&lt;400&gt; 15

Met Ser Gln Ser	Ile Phe His Gln Thr	Val Leu Cys Gln Thr	Gln Thr
1	5	10	15

Val Ala Glu His Gln Ser Lys Val	Ser Ser Leu Glu Val	Ser Ala Asn
20	25	30



BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Lys Gly Lys Lys Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser  
           35                  40                  45

Arg Leu Cys Val Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His  
           50                  55                  60

Arg His Val Asp Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala  
           65                  70                  75                  80

Ser Glu Leu Ser Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln  
                   85                  90                  95

Ile Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe  
                   100                  105                  110

Lys Val Ser Tyr Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val  
           115                  120                  125

Arg Asp Gln Pro Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly  
           130                  135                  140

Thr Lys Asn Tyr Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser  
           145                  150                  155                  160

Asp Ser Gly Ser Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln  
                   165                  170                  175

Ala Ile Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys  
                   180                  185                  190

Asn Asn Gly Glu Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu  
           195                  200                  205

Ser Gln Glu Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr  
           210                  215                  220

Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu  
           225                  230                  235                  240

Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala  
                   245                  250                  255

Arg Gly Thr Ser Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr  
                   260                  265                  270

Lys Ala Ala Glu Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile  
           275                  280                  285

Pro Asp Glu Leu Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala  
           290                  295                  300

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu  
 305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp  
 325 330 335

Ala Ile Arg Lys Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala  
 340 345 350

Lys Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg  
 355 360 365

Lys Lys Arg Asp Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn  
 370 375 380

Ile Val Glu Gln Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu  
 385 390 395 400

His Tyr Ala Asn Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn  
 405 410 415

Lys Thr Ile Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr  
 420 425 430

Lys Asp Ala Gly Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys  
 435 440 445

Pro Phe Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu  
 450 455 460

Val Pro Pro Glu Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu  
 465 470 475 480

Ala Ala Glu Thr Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr  
 485 490 495

Glu Val Gln Ser Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly  
 500 505 510

Ile Pro Phe Val Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly  
 515 520 525

Ser Asn Phe Tyr Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp  
 530 535 540

Phe Gly Asn Gly Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala  
 545 550 555 560

Glu Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile  
 565 570 575

Ala Ser Asp 580 Leu Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu 590  
585

Ala Gly Ile 595 Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile 605  
600

Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val 615 Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln 620  
610

Asp Arg Leu Thr Asp 625 Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln 640  
630 635

Tyr Arg Glu Ile 645 Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly 655  
650

Glu Gly Asp 660 Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln 670  
665

Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly 675 Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys 685  
680

Leu His Asn Asn Thr Ser 690 Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu 700  
695

Ile Asp Tyr Ile Asn 705 Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala 720  
710 715

Leu Asn Asp Asn Arg 725 Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg 735  
730

Ala Ile His 740 Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu 750  
745

Leu Arg Asp 755 Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser 765  
760

Gly Ala Asp 770 Leu Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser 780  
775

Glu Gly Gln Gly Phe 785 Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly 800  
790 795

Leu Pro Thr Gly 805 Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val 815  
810

Glu Glu Lys 820 Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg 830  
825

Gln Glu 835 Leu Gln Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp 845  
840

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Leu Ile Phe Leu Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val  
 850 855 860

Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met  
 865 870 875 880

Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp  
 885 890 895

Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser  
 900 905 910

Met Cys Lys Ile Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val  
 915 920 925

Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln  
 930 935 940

Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val  
 945 950 955 960

Asp Lys Trp Ala Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly  
 965 970 975

Ser Ala Ala Ser Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu  
 980 985 990

Arg Lys Thr Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu  
 995 1000 1005

Thr Val Gly Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln  
 1010 1015 1020

Asn Lys Ser Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val  
 1025 1030 1035

Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr  
 1040 1045 1050

Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg  
 1055 1060 1065

Asn Ser Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu  
 1070 1075 1080

Ala Asn Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Pro  
 1085 1090 1095

Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu Gly Glu Phe  
 1100 1105 1110

Ile Asp 1115 Asp Lys Ser Thr Gln 1120 Leu Lys Asp Val Gly 1125 Ser Val Ser  
 Pro Ile 1130 Ser Leu Ala Arg Lys 1135 Lys Phe Ser Gly Arg 1140 Tyr Ala Val  
 Ser Ser 1145 Glu Glu Phe Thr Gly 1150 Glu Met Val Gly Ala 1155 Lys Ser Arg  
 Asn Ile 1160 Ser Tyr Leu Lys Gly 1165 Lys Val Ala Ser Trp 1170 Ile Gly Ile  
 Pro Thr 1175 Ser Val Ala Ile Pro 1180 Phe Gly Val Phe Glu 1185 His Val Leu  
 Ser Asp 1190 Lys Pro Asn Gln Ala 1195 Val Ala Glu Arg Val 1200 Asn Asn Leu  
 Lys Lys 1205 Lys Leu Thr Glu Gly 1210 Asp Phe Ser Val Leu 1215 Lys Glu Ile  
 Arg Glu 1220 Thr Val Leu Gln Leu 1225 Asn Ala Pro Ser Gln 1230 Leu Val Glu  
 Glu Leu 1235 Lys Thr Lys Met Lys 1240 Ser Ser Gly Met Pro 1245 Trp Pro Gly  
 Asp Glu 1250 Gly Glu Gln Arg Trp 1255 Glu Gln Ala Trp Ile 1260 Ala Ile Lys  
 Lys Val 1265 Trp Gly Ser Lys Trp 1270 Asn Glu Arg Ala Tyr 1275 Phe Ser Thr  
 Arg Lys 1280 Val Lys Leu Asp His 1285 Glu Tyr Leu Ser Met 1290 Ala Val Leu  
 Val Gln 1295 Glu Val Ile Asn Ala 1300 Asp Tyr Ala Phe Val 1305 Ile His Thr  
 Thr Asn 1310 Pro Ala Ser Gly Asp 1315 Ser Ser Glu Ile Tyr 1320 Ala Glu Val  
 Val Lys 1325 Gly Leu Gly Glu Thr 1330 Leu Val Gly Ala Tyr 1335 Pro Gly Arg  
 Ala Leu 1340 Ser Phe Ile Cys Lys 1345 Lys Arg Asp Leu Asn 1350 Ser Pro Gln  
 Val Leu 1355 Gly Tyr Pro Ser Lys 1360 Pro Val Gly Leu Phe 1365 Ile Arg Gln

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly  
 1370 1375 1380

Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Ala  
 1385 1390 1395

Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp Lys Leu Ile Leu Asp  
 1400 1405 1410

Gly Ser Phe Arg Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly  
 1415 1420 1425

Asn Glu Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Thr Pro Gln Asp Ile Glu Gly  
 1430 1435 1440

Val Ile Lys Asp Gly Lys Val Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln  
 1445 1450 1455

Met

<210> 16

<211> 4846

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (158)..(4567)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400813

<309> 2003-12-18

<400> 16  
 ccacgcgtcc ggcttcatct tgctgacgt gtccgtggct tcttgatact ccgtgactgt 60  
 ctccgtccga agcgagtgag caagccgacc aacagcggct gagattcgct gcaacgtcgg 120  
 tatcaaaagg tgtccgagcg gttgagattc gcgtgcc atg tcc gga ttc agt gcc 175  
 Met Ser Gly Phe Ser Ala  
 1 5  
 gcg gcc aac gca gcg gcg gct gag cgg tgc gcg ctc gcg ttc cgc gca 223  
 Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu Ala Phe Arg Ala  
 10 15 20

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cgg ccc gcg gcc tcc tcg cca gcg aag cgg cag cag cag ccg cag cca Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg Gln Gln Pro Gln Pro 25 30 35	271
gcg tcc ctc cga cgc agc ggg ggc cag cgc cgc ccc acg acg ctc tcc Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg Arg Pro Thr Thr Leu Ser 40 45 50	319
gcc tct agc cgc ggc ccc gtc gtg ccg cgc gcc gtc gcc acg tcc gcg Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg Ala Val Ala Thr Ser Ala 55 60 65 70	367
gac cgc gcg tcc ccc gac ctt atc gga aag ttc acg ctg gat tcc aac Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys Phe Thr Leu Asp Ser Asn 75 80 85	415
tcc gag ctc cag gtc gca gtg aac cca gcg ccg cag ggt ttg gtg tca Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala Pro Gln Gly Leu Val Ser 90 95 100	463
gag att agc ctg gag gtg acc aac aca agc ggt tcc ctg att ttg cat Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His 105 110 115	511
tgg gga gcc ctt cgc ccg gac aag aga gat tgg atc ctc ccg tcc aga Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp Trp Ile Leu Pro Ser Arg 120 125 130	559
aaa cct gat gga acg aca gtg tac aag aac agg gct ctc agg aca cct Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro 135 140 145 150	607
ttt gta aag tca ggt gat aac tcc act cta agg att gag ata gat gat Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Arg Ile Glu Ile Asp Asp 155 160 165	655
cct ggg gtg cac gcc att gag ttc ctc atc ttt gac gag aca cag aac Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu Thr Gln Asn 170 175 180	703
aaa tgg ttt aaa aac aat ggc cag aat ttt cag gtt cag ttc cag tcg Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Val Gln Phe Gln Ser 185 190 195	751
agc cgc cat cag ggt act ggt gca tct ggt gcc tcc tct tct gct act Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ser Ser Ala Thr 200 205 210	799
tct acc ttg gtg cca gag gat ctt gtg cag atc caa gct tac ctt cgg Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg 215 220 225 230	847
tgg gaa aga agg gga aag cag tca tac aca cca gag caa gaa aag gag Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu 235 240 245	895
gag tat gaa gct gca cga gct gag tta ata gag gaa gta aac aga ggt Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Asn Arg Gly 250 255 260	943
gtt tct tta gag aag ctt cga gct aaa ttg aca aaa gca cct gaa gca Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Ala Pro Glu Ala 265 270 275	991
cct gag tcg gat gaa agt aaa tct tct gca tct cga atg ccc atc ggt Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser Arg Met Pro Ile Gly 280 285 290	1039

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

aaa Lys 295	ctt Leu	cca Pro	gag Glu	gat Asp	ctt Leu 300	gta Val	cag Gln	gtg Val	cag Gln	gct Ala 305	tat Tyr	ata Ile	agg Arg	tgg Trp	gag Glu 310	1087
caa Gln	gcg Ala	ggc Gly	aag Lys	cca Pro 315	aac Asn	tat Tyr	cct Pro	cct Pro	gag Glu 320	aag Lys	caa Gln	ctg Leu	gta Val	gaa Glu 325	ttt Phe	1135
gag Glu	gaa Glu	gca Ala	agg Arg 330	aag Lys	gaa Glu	ctg Leu	cag Gln	gct Ala 335	gag Glu	gtg Val	gac Asp	aag Lys	gga Gly 340	atc Ile	tct Ser	1183
att Ile	gat Asp	cag Gln 345	ttg Leu	agg Arg	cag Gln	aaa Lys	att Ile 350	ttg Leu	aaa Lys	gga Gly	aac Asn	att Ile 355	gag Glu	agt Ser	aaa Lys	1231
gtt Val	tcc Ser 360	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	aag Lys	aac Asn 365	aag Lys	aag Lys	tac Tyr	ttc Phe	tct Ser 370	gta Val	gaa Glu	agg Arg	att Ile	1279
cag Gln 375	cgc Arg	aaa Lys	aag Lys	aga Arg	gat Asp 380	atc Ile	aca Thr	caa Gln	ctt Leu	ctc Leu 385	agt Ser	aaa Lys	cat His	aag Lys	cat His 390	1327
aca Thr	ctt Leu	gtg Val	gaa Glu	gat Asp 395	aaa Lys	gta Val	gag Glu	gtt Val	gta Val 400	cca Pro	aaa Lys	caa Gln	cca Pro	act Thr 405	gtt Val	1375
ctt Leu	gat Asp	ctc Leu	ttc Phe 410	acc Thr	aag Lys	tct Ser	tta Leu	cat His 415	gag Glu	aag Lys	gat Asp	ggc Gly 420	tgt Cys	gaa Glu	gtt Val	1423
cta Leu	agc Ser	aga Arg 425	aag Lys	ctc Leu	ttc Phe	aag Lys	ttc Phe 430	ggc Gly	gat Asp	aaa Lys	gag Glu	ata Ile 435	ctg Leu	gca Ala	att Ile	1471
tct Ser	acc Thr 440	aag Lys	gtt Val	caa Gln	aat Asn	aaa Lys 445	aca Thr	gaa Glu	gtt Val	cac His	ttg Leu 450	gca Ala	aca Thr	aac Asn	cat His	1519
acc Thr 455	gac Asp	cca Pro	ctt Leu	att Ile	ctt Leu 460	cac His	tgg Trp	tct Ser	ttg Leu	gca Ala 465	aaa Lys	aat Asn	gct Ala	gga Gly	gaa Glu 470	1567
tgg Trp	aag Lys	gca Ala	cct Pro	tct Ser 475	cca Pro	aat Asn	ata Ile	ttg Leu	cca Pro 480	tct Ser	ggt Gly	tcc Ser	aca Thr	ttg Leu 485	ctg Leu	1615
gac Asp	aag Lys	gcg Ala	tgt Cys 490	gaa Glu	act Thr	gaa Glu	ttt Phe	act Thr 495	aaa Lys	tct Ser	gaa Glu	ttg Leu	gat Asp 500	ggt Gly	ttg Leu	1663
cat His	tac Tyr	cag Gln 505	gtt Val	gtt Val	gag Glu	ata Ile	gag Glu 510	ctt Leu	gat Asp	gat Asp	gga Gly	gga Gly 515	tac Tyr	aaa Lys	gga Gly	1711
atg Met	cca Pro 520	ttt Phe	gtt Val	ctt Leu	cgg Arg	tct Ser 525	ggt Gly	gaa Glu	aca Thr	tgg Trp	aaa Lys 530	aaa Lys	aat Asn	aat Asn	ggt Gly	1759
tct Ser 535	gat Asp	ttt Phe	ttc Phe	cta Leu 540	gat Asp	ttc Phe	agc Ser	acc Thr	cat His	gat Asp 545	gtc Val	aga Arg	aat Asn	att Ile	aag Lys 550	1807
tta Leu	aag Lys	ggc Gly	aat Asn	ggt Gly 555	gat Asp	gct Ala	ggt Gly	aaa Lys	ggt Gly 560	act Thr	gct Ala	aag Lys	gca Ala	ttg Leu 565	ctg Leu	1855



## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gag Glu	aga Arg	ata Ile	gca Ala 570	gat Asp	ctg Leu	gag Glu	gaa Glu 575	gat Asp 575	gcc Ala	cag Gln	cga Arg	tct Ser 580	ctt Leu 580	atg Met	cac His	1903
aga Arg	ttc Phe	aat Asn 585	att Ile	gca Ala	gca Ala	gat Asp	cta Leu 590	gct Ala	gac Asp	caa Gln	gcc Ala	aga Arg 595	gat Asp	gct Ala	gga Gly	1951
ctt Leu	ttg Leu 600	ggt Gly	att Ile	gtt Val	ggg Gly	ctt Leu 605	ttt Phe	gtt Val	tgg Trp	att Ile	aga Arg 610	ttc Phe	atg Met	gct Ala	acc Thr	1999
agg Arg 615	caa Gln	cta Leu	aca Thr	tgg Trp	aat Asn 620	aag Lys	aac Asn	tat Tyr	aat Asn	gtg Val 625	aag Lys	cca Pro	cgt Arg	gag Glu	ata Ile 630	2047
agc Ser	aaa Lys	gca Ala	cag Gln	gat Asp 635	agg Arg	ttt Phe	aca Thr	gat Asp	gat Asp 640	ctt Leu	gag Glu	aat Asn	atg Met	tac Tyr 645	aaa Lys	2095
gct Ala	tat Tyr	cca Pro	cag Gln 650	tac Tyr	aga Arg	gag Glu	ata Ile	tta Leu 655	aga Arg	atg Met	ata Ile	atg Met	gct Ala 660	gct Ala	gtt Val	2143
ggt Gly	cgc Arg	gga Gly 665	ggt Gly	gaa Glu	ggt Gly	gat Asp	gtt Val 670	ggt Gly	caa Gln	cgc Arg	att Ile	cgt Arg 675	gat Asp	gag Glu	ata Ile	2191
tta Leu	gta Val 680	ata Ile	cag Gln	aga Arg	aat Asn	aat Asn 685	gac Asp	tgc Cys	aaa Lys	ggt Gly	gga Gly 690	atg Met	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	2239
tgg Trp 695	cac His	cag Gln	aaa Lys	ttg Leu	cac His 700	aac Asn	aat Asn	aca Thr	agc Ser	cca Pro 705	gat Asp	gat Asp	gta Val	gtg Val	ata Ile 710	2287
tgc Cys	cag Gln	gcc Ala	tta Leu 715	att Ile	gat Asp	tat Tyr	atc Ile	aag Lys	agt Ser 720	gac Asp	ttt Phe	gat Asp	ata Ile	agc Ser 725	gtt Val	2335
tac Tyr	tgg Trp	gac Asp	acc Thr 730	ttg Leu	aac Asn	aaa Lys	aat Asn	ggc Gly 735	ata Ile	acc Thr	aaa Lys	gag Glu	cgt Arg 740	ctc Leu	ttg Leu	2383
agc Ser	tat Tyr	gat Asp 745	cgt Arg	gct Ala	att Ile	cat His	tca Ser 750	gaa Glu	cca Pro	aat Asn	ttc Phe 755	aga Arg 755	agt Ser	gaa Glu	cag Gln	2431
aag Lys	gcg Ala 760	ggt Gly	tta Leu	ctc Leu	cgt Arg	gac Asp 765	ctg Leu	gga Gly	aat Asn	tac Tyr	atg Met 770	aga Arg	agc Ser	cta Leu	aag Lys	2479
gct Ala 775	gtg Val	cat His	tct Ser	ggt Gly	gct Ala 780	gat Asp	ctt Leu	gaa Glu	tct Ser	gct Ala 785	ata Ile	gca Ala	agt Ser	tgt Cys	atg Met 790	2527
gga Gly	tac Tyr	aaa Lys	tca Ser 795	gag Glu	ggt Gly	gaa Glu	ggt Gly	ttc Phe	atg Met 800	gtt Val	ggt Gly	gtt Val	cag Gln	atc Ile 805	aat Asn	2575
cca Pro	gtg Val	aag Lys	ggt Gly 810	tta Leu	cca Pro	tct Ser	gga Gly	ttt Phe 815	ccg Pro	gag Glu	ttg Leu	ctt Leu	gaa Glu 820	ttt Phe	gtg Val	2623
ctt Leu	gaa Glu	cat His 825	gtt Val	gag Glu	gat Asp	aaa Lys	tca Ser 830	gcg Ala	gaa Glu	cca Pro	ctt Leu	ctt Leu 835	gag Glu	ggg Gly	cta Leu	2671

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttg gaa gct cga gtt gaa ctg cgc cct ttg ctt ctt gat tcg cgt gaa	2719
Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Asp Ser Arg Glu	
840 845 850	
cgc atg aaa gat ctt ata ttt ttg gac att gct ctt gat tct acc ttc	2767
Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe	
855 860 865 870	
agg aca gca att gaa agg tca tat gag gag ctg aat gat gca gcc cca	2815
Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asp Ala Ala Pro	
875 880 885	
gag aaa ata atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gcg ctt	2863
Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu	
890 895 900	
tca att gac gac aat gaa gac atc ctg tat tgt tta aag gga tgg aac	2911
Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn	
905 910 915	
caa gcc ttg gaa atg gct aag caa aaa gac gac caa tgg gcg ctc tat	2959
Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp Asp Gln Trp Ala Leu Tyr	
920 925 930	
gct aaa gca ttt ctt gac aga aac aga ctt gcc ctt gcg agc aag gga	3007
Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly	
935 940 945 950	
gaa caa tac cat aat atg atg cag ccc tct gct gag tat ctt gcc tcg	3055
Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser	
955 960 965	
tta ctc agc ata gac caa tgg gca gtc aat atc ttc aca gaa gaa att	3103
Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile	
970 975 980	
ata cgc ggt gga tca gct gct act ctg tct gct ctt ctg aac cga ttt	3151
Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Asn Arg Phe	
985 990 995	
gat cct gtt tta agg aat gtt gct cac ctc gga agt tgg cag gtt	3196
Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val	
1000 1005 1010	
ata agc ccg gtt gaa gta tca ggt tat gtg gtt gtg gtt gat gag	3241
Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu	
1015 1020 1025	
tta ctt gct gtc cag aac aaa tct tat gat aaa cca acc atc ctt	3286
Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu	
1030 1035 1040	
gtg gca aag agt gtc aag gga gag gaa gaa ata cca gat gga gta	3331
Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val	
1045 1050 1055	
gtt ggt gta att aca cct gat atg cca gat gtt ctg tct cat gtg	3376
Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val	
1060 1065 1070	
tca gtc cga gca agg aat agc aag gta ctg ttt gcg acc tgt ttt	3421
Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe	
1075 1080 1085	
gac cac acc act cta tct gaa ctt gaa gga tat gat cag aaa ctg	3466
Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly Tyr Asp Gln Lys Leu	
1090 1095 1100	

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt tcc	ttc aag	cct act	tct gca	gat ata	acc tat	agg gag	atc	3511
Phe Ser	Phe Lys	Pro Thr	Ser Ser	Ala Asp	Ile Thr	Arg Glu	Ile	
1105			1110			1115		
aca gag	agt gaa	ctt cag	caa tca	agt tct	cca aat	gca gaa	ggt	3556
Thr Glu	Ser Glu	Leu Gln	Gln Ser	Ser Ser	Pro Asn	Ala Glu	Val	
1120			1125			1130		
ggc cat	gca gta	cca tct	att tca	ttg gcc	aag aag	aaa ttt	ctt	3601
Gly His	Ala Val	Pro Ser	Ile Ser	Leu Ala	Lys Lys	Lys Phe	Leu	
1135			1140			1145		
gga aaa	tat gca	ata tca	gcc gaa	gaa gaa	ttc tct	gag gaa	atg gtt	3646
Gly Lys	Tyr Ala	Ile Ser	Ala Glu	Glu Glu	Phe Ser	Glu Met	Val	
1150			1155			1160		
ggg gcc	aag tct	cgg aat	ata gca	tac ctc	aaa gga	aaa gta	cct	3691
Gly Ala	Lys Ser	Arg Asn	Ile Ala	Tyr Leu	Lys Gly	Lys Val	Pro	
1165			1170			1175		
tca tgg	gtc ggt	gtc cca	acg tca	ggt gcc	ata cca	ttt ggc	act	3736
Ser Trp	Val Gly	Val Pro	Thr Thr	Ser Val	Ala Ile	Phe Gly	Thr	
1180			1185			1190		
ttt gag	aag gtt	ttg tca	gat ggg	ctt aat	aag gaa	gta gca	cag	3781
Phe Glu	Lys Val	Leu Ser	Asp Gly	Leu Asn	Lys Glu	Val Ala	Gln	
1195			1200			1205		
agc ata	gag aag	ctt aag	atc aga	ctt gcc	caa gaa	gat ttt	agt	3826
Ser Ile	Glu Lys	Leu Lys	Ile Arg	Leu Ala	Gln Glu	Asp Phe	Ser	
1210			1215			1220		
gct cta	ggt gaa	ata aga	aaa gtc	gtc gtc	ctt aat	ctt act	gct cct	3871
Ala Leu	Gly Glu	Ile Arg	Lys Val	Val Val	Leu Asn	Leu Thr	Ala Pro	
1225			1230			1235		
atg caa	ttg gtt	aat gag	ctg aag	gag gag	agg atg	cta ggc	tct gga	3916
Met Gln	Leu Val	Asn Glu	Leu Lys	Glu Glu	Arg Met	Leu Gly	Ser Gly	
1240			1245			1250		
atg ccc	tgg cct	ggt gat	gaa gga	gac aag	cgt tgg	gag caa	gca	3961
Met Pro	Trp Pro	Gly Asp	Glu Gly	Asp Lys	Arg Trp	Glu Gln	Ala	
1255			1260			1265		
tgg atg	gct att	aaa aag	gtt tgg	gca tca	aaa tgg	aac gaa	aga	4006
Trp Met	Ala Ile	Lys Lys	Val Trp	Ala Ser	Lys Trp	Asn Glu	Arg	
1270			1275			1280		
gca tat	ttt agc	aca cgc	aag gtg	aaa ctt	gat cat	gag tac	ctt	4051
Ala Tyr	Phe Ser	Thr Arg	Lys Val	Lys Leu	Asp His	Glu Tyr	Leu	
1285			1290			1295		
tcg atg	gct gtt	ctc gtg	caa gaa	gtt gtg	aat gca	gat tat	gct	4096
Ser Met	Ala Val	Leu Val	Gln Glu	Val Val	Asn Ala	Asp Tyr	Ala	
1300			1305			1310		
ttt gtc	att cat	acc aca	aac cca	tcg tct	gga gat	tct tct	gag	4141
Phe Val	Ile His	Thr Thr	Asn Pro	Ser Ser	Gly Asp	Ser Ser	Glu	
1315			1320			1325		
ata tat	gct gaa	gtg gtg	aaa ggg	ctt ggc	gag acc	ctc gtg	gga	4186
Ile Tyr	Ala Glu	Val Val	Lys Gly	Leu Gly	Glu Thr	Leu Val	Gly	
1330			1335			1340		
gcc tat	cct ggt	cgt gct	atg agc	ttt gtt	tgc aaa	aaa gat	gac	4231
Ala Tyr	Pro Gly	Arg Ala	Met Ser	Phe Val	Cys Lys	Lys Asp	Asp	
1345			1350			1355		

## BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt gac tct ccc aag tta ctt ggt tac cca agc aag cca att ggt	4276
Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly	
1360 1365 1370	
ctc ttc ata agg caa tca atc atc ttc cgt tcc gac tcc aac ggt	4321
Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly	
1375 1380 1385	
gag gac ctg gaa ggt tat gct gga gca gga tta tat gat agt gta	4366
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val	
1390 1395 1400	
ccg atg gat gag gag gat gag gtt gta ctt gat tat aca act gac	4411
Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp	
1405 1410 1415	
cct ctt ata gta gac cgt gga ttc cga agc tca atc ctc tca agc	4456
Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser Ser Ile Leu Ser Ser	
1420 1425 1430	
ata gca cgg gct ggc cat gcc atc gag gag cta tat ggt tct cct	4501
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro	
1435 1440 1445	
cag gac gtc gag gga gta gtg aag gat gga aaa atc tat gta gtc	4546
Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val	
1450 1455 1460	
cag aca aga cca cag atg tag tatgtatgca tctattagac agctcaataa	4597
Gln Thr Arg Pro Gln Met	
1465	
gcactgttgt acgcttgtat ggttgggaca tatgggcggt atggcatgta tagttgtatg	4657
cctagatgta caacacgtgt actcgtatat atatatataa atgctgaaac aagcattggg	4717
cctgtactgt agtttctaca ttccattgtc accaataatt aagtgtactc ctatggctgg	4777
gagtctatga aaatggacgt gttgacttat tgggtaataa ataatttata taaaaaaaaa	4837
aaaaaaaaag	4846

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 17

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg
20 25 30

Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg
35 40 45

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Arg Pro Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg  
 50 55 60

Ala Val Ala Thr Ser Ala Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys  
 65 70 75 80

Phe Thr Leu Asp Ser Asn Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala  
 85 90 95

Pro Gln Gly Leu Val Ser Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser  
 100 105 110

Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp  
 115 120 125

Trp Ile Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn  
 130 135 140

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu  
 145 150 155 160

Arg Ile Glu Ile Asp Asp Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile  
 165 170 175

Phe Asp Glu Thr Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe  
 180 185 190

Gln Val Gln Phe Gln Ser Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly  
 195 200 205

Ala Ser Ser Ser Ala Thr Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln  
 210 215 220

Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr  
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile  
 245 250 255

Glu Glu Val Asn Arg Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu  
 260 265 270

Thr Lys Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala  
 275 280 285

Ser Arg Met Pro Ile Gly Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln  
 290 295 300

Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu  
 305 310 315 320

Lys Gln Leu Val<sub>325</sub> Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu<sub>335</sub>  
 Val Asp Lys Gly<sub>340</sub> Ile Ser Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys<sub>350</sub>  
 Gly Asn Ile<sub>355</sub> Glu Ser Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr<sub>365</sub>  
 Phe Ser Val<sub>370</sub> Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu<sub>380</sub>  
 Leu Ser Lys His Lys His Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val<sub>400</sub>  
 Pro Lys Gln Pro Thr<sub>405</sub> Val Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His Glu<sub>415</sub>  
 Lys Asp Gly Cys<sub>420</sub> Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp<sub>430</sub>  
 Lys Glu Ile<sub>435</sub> Leu Ala Ile Ser Thr Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val<sub>445</sub>  
 His Leu Ala Thr Asn His Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu<sub>460</sub>  
 Ala Lys Asn Ala Gly Glu Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro<sub>480</sub>  
 Ser Gly Ser Thr<sub>485</sub> Leu Leu Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys<sub>495</sub>  
 Ser Glu Leu Asp<sub>500</sub> Gly Leu His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp<sub>510</sub>  
 Asp Gly Gly Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr<sub>525</sub>  
 Trp Lys Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His<sub>540</sub>  
 Asp Val Arg Asn Ile Lys Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly<sub>560</sub>  
 Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala<sub>575</sub>  
 Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ala Asp<sub>590</sub>

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Gln Ala Arg Asp Ala Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp  
 595 600 605

Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Thr Trp Asn Lys Asn Tyr Asn  
 610 615 620

Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp  
 625 630 635 640

Leu Glu Asn Met Tyr Lys Ala Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg  
 645 650 655

Met Ile Met Ala Ala Val Gly Arg Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln  
 660 665 670

Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys  
 675 680 685

Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser  
 690 695 700

Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser  
 705 710 715 720

Asp Phe Asp Ile Ser Val Tyr Trp Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile  
 725 730 735

Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro  
 740 745 750

Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn  
 755 760 765

Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser  
 770 775 780

Ala Ile Ala Ser Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met  
 785 790 795 800

Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro  
 805 810 815

Glu Leu Leu Glu Phe Val Leu Glu His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu  
 820 825 830

Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu  
 835 840 845

Leu Leu Asp Ser Arg Glu Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile  
 850 855 860

Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu  
 865 870 875 880  
 Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val  
 885 890 895  
 Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr  
 900 905 910  
 Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp  
 915 920 925  
 Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu  
 930 935 940  
 Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser  
 945 950 955 960  
 Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn  
 965 970 975  
 Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser  
 980 985 990  
 Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu  
 995 1000 1005  
 Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val  
 1010 1015 1020  
 Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp  
 1025 1030 1035  
 Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu  
 1040 1045 1050  
 Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp  
 1055 1060 1065  
 Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu  
 1070 1075 1080  
 Phe Ala Thr Cys Phe Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly  
 1085 1090 1095  
 Tyr Asp Gln Lys Leu Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile  
 1100 1105 1110  
 Thr Tyr Arg Glu Ile Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser Ser  
 1115 1120 1125



BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Pro Asn Ala Glu Val Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala  
1130 1135 1140

Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe  
1145 1150 1155

Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu  
1160 1165 1170

Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala  
1175 1180 1185

Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn  
1190 1195 1200

Lys Glu Val Ala Gln Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala  
1205 1210 1215

Gln Glu Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu  
1220 1225 1230

Asn Leu Thr Ala Pro Met Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg  
1235 1240 1245

Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys  
1250 1255 1260

Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser  
1265 1270 1275

Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu  
1280 1285 1290

Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Val Val  
1295 1300 1305

Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser  
1310 1315 1320

Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly  
1325 1330 1335

Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val  
1340 1345 1350

Cys Lys Lys Asp Asp Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro  
1355 1360 1365

Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg  
1370 1375 1380

BCS 04-5003\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser Asp 1385 Ser Asn Gly Glu Asp 1390 Leu Glu Gly Tyr Ala 1395 Gly Ala Gly

Leu Tyr 1400 Asp Ser Val Pro Met 1405 Asp Glu Glu Asp Glu 1410 Val Val Leu

Asp Tyr 1415 Thr Thr Asp Pro Leu 1420 Ile Val Asp Arg Gly 1425 Phe Arg Ser

Ser Ile 1430 Leu Ser Ser Ile Ala 1435 Arg Ala Gly His Ala 1440 Ile Glu Glu

Leu Tyr 1445 Gly Ser Pro Gln Asp 1450 Val Glu Gly Val Val 1455 Lys Asp Gly

Lys Ile 1460 Tyr Val Val Gln Thr 1465 Arg Pro Gln Met

